

Requested document:	WO02097421 click here to view the pdf document
---------------------	--

ELECTROPHORESIS METHODS

Patent Number: WO02097421
Publication date: 2002-12-05
Inventor(s): BABA YOSHINOBU (JP); TABUCHI MARI (JP)
Applicant(s): JAPAN SCIENCE & TECH CORP (JP); BABA YOSHINOBU (JP); TABUCHI MARI (JP)
Requested Patent: [WO02097421](#)
Application Number: WO2001JP04510 20010529
Priority Number(s): WO2001JP04510 20010529
IPC Classification: G01N27/447
EC Classification: G01N27/447B5
Equivalents: CA2448728
Cited Documents: EP0809103; JP2000081417; US5069766; US5482608; EP0386925

Abstract

Separation carriers containing &bgr;-1,3-glucane and/or methylcellulose;
electrophoretic buffers containing the same; a capillary or microchip electrophoresis method wherein a sample containing a polymer compound is electrophoresed in the presence of the above buffer;
a capillary or microchip electrophoresis method wherein a sample is injected by electrical or pressurizing injection ;
a method of analyzing a polymer compound by the above electrophoresis method.
These methods, by which high separability can be quickly established, are useful in high through-put screening analysis of proteins or sugar chains in gene analysis, proteome analysis or glycome analysis and applicable to clinical examination apparatuses and clarification of biological functions, disease onset mechanisms, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年12月5日 (05.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/097421 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 27/447
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04510
(22) 国際出願日: 2001年5月29日 (29.05.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田渕眞理
(TABUCHI, Mari) [JP/JP]; 〒770-0005徳島県徳島市南矢三町3丁目5-15-307 Tokushima (JP). 馬場嘉信 (BABA, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒770-0047徳島県徳島市名東町一丁目114-15 Tokushima (JP).
(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-0012大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
(81) 指定国(国内): CA, CN, JP, KR, US.
(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
規則4.17に規定する申立て:
— JP, KRの指定のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

/競葉有/

(54) Title: ELECTROPHORESIS METHODS

(54) 発明の名称: 電気泳動法

(57) Abstract: Separation carriers containing β -1,3-glucane and/or methylcellulose; electrophoretic buffers containing the same; a capillary or microchip electrophoresis method wherein a sample containing a polymer compound is electrophoresed in the presence of the above buffer; a capillary or microchip electrophoresis method wherein a sample is injected by electrical or pressurizing injection; a method of analyzing a polymer compound by the above electrophoresis method. These methods, by which high separability can be quickly established, are useful in high through-put screening analysis of proteins or sugar chains in gene analysis, proteome analysis or glycome analysis and applicable to clinical examination apparatuses and clarification of biological functions, disease onset mechanisms, etc.

(57) 要約:

β -1, 3-グルカン及び/又はメチルセルロースを含有した分離用担体; それを含有した泳動用緩衝液; 該緩衝液の存在下に、高分子化合物を含有した試料を泳動する、キャピラリーまたはマイクロチップ電気泳動法; 電気的試料注入又は加圧によりインジェクトする、キャピラリーまたはマイクロチップ電気泳動法; 並びに該電気泳動法により、高分子化合物を解析する方法。本発明によれば、迅速に、高い分離能を得ることができ、遺伝子解析、プロテオーム解析またはグライコーム解析におけるタンパク質または糖鎖の High Through-p u t スクリーニング解析に有用であり、医療診療装置への応用、および生体機能、疾患発症機構などの解明への応用が可能になる。

WO 02/097421 A1



添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

電気泳動法

技術分野

本発明は、高分子化合物の泳動に適し、簡便、かつ迅速に、高い分離能を得ることができる、遺伝子解析、プロテオーム解析、グライコーム解析などへの応用が可能な、電気泳動法および高分子化合物の解析方法に関する。さらに詳しくは、電気泳動において、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（例えば、DNA、RNA）などの高分子化合物を迅速にかつ高い分離能で分離することができる、分離用担体、泳動用緩衝液、電気泳動法ならびに該高分子化合物の解析方法に関する。

背景技術

ヒトゲノム解析に伴い、ゲノム機能の解明が期待されている。具体的には、例えば、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析、グライコーム解析などにより、塩基配列情報に基づく転写産物の発現や遺伝子産物（タンパク質）、生体内代謝産物、糖鎖などの機能を解明し、それにより、疾患発症機構を解明されることが期待される。また、前記疾患発症機構の解明により、かかる疾患の予防、治療などへの応用が期待される。

現在、例えば、プロテオーム解析に関し、2次元電気泳動によるタンパク質のプロファイリングなどが行なわれている。しかしながら、前記2次元電気泳動は、操作が煩雑であること、操作に時間を要すること、多量の試料を要することなどの欠点を有する。

また、タンパク質や糖鎖の解析のために、キャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動が用いられる場合もある。しかしながら、タンパク質を、かかるキャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動により解析する場合、該タン

パク質がキャピラリーに吸着する場合があるため、展開が妨げられ、解析が困難になる場合があるという欠点を有する。

さらに、従来の電気泳動においては、分離時間の高速化に限界があり、高速化の達成のために、高電圧をかけることにより、電気泳動が行なわれるが、高電圧下での分離により、分離能が低下する場合があるという欠点を有する。

したがって、操作が簡便であり、迅速に、高い分離能を得ることが可能な、高分子化合物、具体的には、タンパク質や糖鎖の High Through-putスクリーニング解析のための手法の確立が望まれている。

発明の開示

本発明は、高分子化合物の泳動に適し、操作が簡便であり、迅速に、高い分離能を得ることができる、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（例えば、DNA、RNAなど）などの高分子化合物の解析が可能な分離用担体、泳動用緩衝液および電気泳動法、ならびに該電気泳動法に基づく該高分子化合物の解析方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明の要旨は、

(1) β -グルカンおよびメチルセルロースからなる群より選ばれた1種の化合物を含有してなる、キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための分離用担体、

(2) β -グルカンとして、 β -1, 3-グルカンを含むラミナラン、 β -1, 3-グルカンを含むカードラン、 β -1, 3-グルカンを含む植物抽出物、 β -1, 3-グルカンを含む海藻抽出物、 β -1, 3-グルカンを含む酵母抽出物、 β -1, 3-グルカンを含む真菌抽出物、および β -1, 3-グルカンを含む真菌の培養液からなる群より選ばれた少なくとも1種を含有してなる、前記(1)記載の分離用担体、

(3) β -グルカンとして、 β -1, 3-グルカンを含む海藻抽出物を含有し

てなる、前記〔1〕記載の分離用担体、

〔4〕 海藻抽出物が、原藻を、水抽出、酸アルカリ抽出および溶媒抽出からなる群より選ばれた1種の抽出法により処理することにより得られた抽出物である、前記〔3〕記載の分離用担体、

〔5〕 前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の分離用担体を含有してなる、キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための泳動用緩衝液。

〔6〕 下記(1)～(3)：

(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、および

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリス-ホウ酸緩衝液を含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつメチルセルロースを0.01～0.5重量%の濃度で含有してなる、前記〔5〕記載の泳動用緩衝液、

〔7〕 下記(1)～(4)：

(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリス-ホウ酸緩衝液を含有した緩衝液

(4) 前記(3)において、0.001～1.0重量%のメチルセルロースをさらに含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつカーボランを0.0000

0.1～0.1重量%の濃度で含有してなる、前記〔5〕記載の泳動用緩衝液、

〔8〕 下記(1)～(4)：

(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリスーホウ酸緩衝液を含有した緩衝液

(4) 前記(3)において、0.001～1.0重量%のメチルセルロースをさらに含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつ海藻抽出物を0.0000
0.1～0.1重量%の濃度で含有してなる、前記〔5〕記載の泳動用緩衝液、

〔9〕 キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動において、前記〔5〕～〔8〕いずれか1項に記載の泳動用緩衝液の存在下に、高分子化合物を含有した試料を泳動することを特徴とする、電気泳動法、

〔10〕 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、前記〔9〕記載の電気泳動法、

〔11〕 キャピラリー電気泳動において、高分子化合物を含有した試料をキャピラリーにインジェクトし、ついで、加圧し、該試料を、高分子化合物の分離が可能な泳動電場下に泳動することを特徴とする、電気泳動法、

〔12〕 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、前記〔11〕記載の電気泳動法、

〔13〕 キャピラリー電気泳動において、

(a) 試料注入口とアウトレットとを備え、かつ泳動用緩衝液が充填されたキャピラリーの試料注入口から、加圧または電気的注入により試料をインジェクトするステップ〔ステップ(a)という〕、および

(b) 加圧し、ついで、試料を泳動するステップ〔ステップ(b)という〕を含むプロセスを行なう、前記〔11〕または〔12〕記載の電気泳動法、

〔14〕 ステップ(a)において、キャピラリーのアウトレットに水または泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、該試料をキャピラリーにインジェクトし、ステップ(b)において、水または緩衝液を加圧する、前記〔13〕記載の電気泳動法、

〔15〕 ステップ(a)において、1～30kV、1～30秒での電気的注入により、該試料をキャピラリーにインジェクトし、

ステップ(b)において、20V/cm～10kV/cmの泳動電場下に泳動する、前記〔13〕または〔14〕記載の電気泳動法、

〔16〕 ステップ(a)において、1～30kV、1～60秒での電気的注入により、該試料をキャピラリーにインジェクトし、ステップ(b)において、2～50mbar、2～30秒で加圧する、前記〔13〕または〔14〕記載の電気泳動法。

〔17〕 前記〔5〕～〔8〕いずれか1項に記載の泳動用緩衝液の存在下に、試料を泳動する、前記〔11〕～〔16〕いずれか1項に記載の電気泳動法、

〔18〕 マイクロチップ電気泳動において、

(A) ローディングチャネルと、該ローディングチャネルに交差する分離用チャネルとを備え、かつ該ローディングチャネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップであって、該ローディングチャネルおよび分離用チャネルに泳動用緩衝液が充填されたマイクロチップを用い、

該ローディングチャネルに電圧又は圧力を負荷して、高分子化合物を含有した試料を該試料リザーバーから供給して、分離用チャネルに導入するステップ〔ステップ(A)という〕、ならびに

(B) 分離用チャネルを加圧し、ついで、該試料を泳動するステップ〔ステップ

(B) という)

を含むプロセスを行なうことを特徴とする、電気泳動法、

(19) 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、前記〔18〕記載の電気泳動法、

(20) ステップ(B)における加圧の際の圧力の大きさを調節することにより、分離能を調整する、前記〔18〕または〔19〕記載の電気泳動法、

(21) ステップ(A)において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、ローディングチャネルを電圧を負荷することにより、試料を該分離用チャネルに導入し、

ステップ(B)において、ローディングチャネルに電圧を負荷し、かつ分離用チャネルを電圧を負荷することにより、試料を泳動する、前記〔18〕～〔20〕いずれか1項に記載の電気泳動法、

(22) ステップ(A)において、ローディングチャネルに10～500Vの電圧(ローディング電圧)2～60秒を負荷し、

ステップ(B)において、ローディングチャネルに10～500Vの電圧(スクイージング電圧)を負荷し、かつ分離用チャネルに20V/cm～50kV/cmの電場を負荷する、前記〔21〕記載の電気泳動法、

(23) ステップ(A)において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、試料リザーバーを加圧することにより、試料を該分離用チャネルに導入し、

ステップ(B)において、分離用チャネルを加圧し、ついで、試料を泳動する、前記〔18〕～〔20〕いずれか1項に記載の電気泳動法、

(24) ステップ(A)において、試料リザーバーに1～1520mbarの圧力を加圧し、

ステップ(B)において、分離用チャネルに1～1520mbarを加圧し、ついで、20V/cm～50kV/cmの電場を負荷する、前記〔23〕記載の電

気泳動法、

(25) 分子量9～205kDaのタンパク質を15秒以内に分離する、前記

(18)～(24)いずれか1項に記載の電気泳動法。

(26) 2～100個の単糖を構成糖として有する糖を15秒以内に分離する、前記(18)～(24)いずれか1項に記載の電気泳動法、

(27) 10塩基～10キロ塩基の核酸を50秒以内に分離しうる、前記(18)～(24)いずれか1項に記載の電気泳動法、

(28) 前記(9)～(27)いずれか1項に記載の電気泳動法により、高分子化合物を含有した試料を泳動して、該高分子化合物を分離し、分離された高分子化合物を検出して移動度を測定することを特徴とする、高分子化合物の解析方法、

(29) 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖および核酸からなる群より選ばれた1種である、前記(28)記載の高分子化合物の解析方法、ならびに

(30) UV波長光の吸収、蛍光検出、電気化学的検出および化学発光検出からなる群より選ばれた少なくとも1種により、分離された高分子化合物を検出する、前記(28)または(29)記載の高分子化合物の解析方法、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、キャピラリー電気泳動において、試料注入時における至適条件および泳動時における泳動電圧の至適条件を検討した結果を示す図である。図中、各パネルは、以下の通りである：パネルA、試料注入時5kVで5秒、泳動電圧3.75kV；パネルB、試料注入時5kVで5秒、泳動電圧6.5kV；パネルC、試料注入時5kVで5秒、泳動電圧15kV；パネルD、試料注入時8kVで8秒、泳動電圧10kV；パネルE、試料注入時8kVで8秒、泳動電圧15

kV。また、各ピークは、以下の通りである：1、Bardykinin (MW: 1,060)；2、Angiotensin II (MW: 1,046)；3、 α -Melanocyte stimulating hormone (MW: 1,665)；4、Thyrotropin releasing hormone (MW: 362)；5、Luteinizing hormone releasing hormone (MW: 1,182)；6、Leucine enkephalin (MW: 392)；7、Bombesin (MW: 1,620)；8、Methionine enkephalin (MW: 574)；9、Oxytocin (MW: 1,007)。

第2図は、有効長24cmのキャピラリーと有効長8.5cmのキャピラリーによる移動時間および分離能への影響を比較した結果を示す図である。

第3図は、試料注入後で、かつ泳動前の加圧による移動時間への影響を調べた結果を示す図である。各加圧条件は、以下の通りである：パネルA、試料注入後に加圧なし；パネルB、試料注入後に加圧、加圧は、緩衝液をアウトレットにセッティングした条件下に行なった；パネルC、試料注入後に加圧、加圧は、緩衝液をアウトレットにセッティングしない条件下に行なった。

第4図は、試料注入条件を検討した結果を示す図である。なお、試料は、アウトレットに緩衝液をセッティングせずに注入された。各試料注入条件について、パネルAは、試料注入後、加圧なし；パネルBは、試料注入後、10mbarで6秒加圧、試料注入口：水、アウトレット：緩衝液なし；パネルCは、試料注入後、10mbarで6秒加圧、試料注入口：水、アウトレット：水；パネルDは、試料注入後、10mbarで8秒加圧、試料注入口：水、アウトレット：緩衝液；パネルEは、試料注入後、10mbarで7秒加圧、試料注入口：緩衝液、アウトレット：緩衝液である。

第5図は、第4図のパネルDにおける条件において、加圧時間による移動時間および分離能への影響を検討した結果を示す図である。各加圧時間について、パネルAは、10mbarで2秒、パネルBは、10mbarで6秒、パネルCは、10mbarで8秒である。

第6図は、 β -1, 3-グルカン（カードラン）を分離用担体として添加した

系（終濃度0.0001重量%）を用いて、移動時間、分離能への影響を調べた結果を示す図である。パネルAは、カードランを添加しない条件、パネルA'は、カードランを添加した条件を示す。

第7図は、メチルセルロースの添加によるペプチドの移動時間および分解能への影響を示す図である。パネルAは、無添加、パネルBは、0.5%メチルセルロース添加、パネルCは、0.1%メチルセルロース添加を示す。

第8図は、多糖類の添加によるペプチドの移動時間および分解能への影響を示す図である。パネルAは、無添加、パネルBは、0.001%カードラン添加、パネルCは、0.0001%カードラン添加、パネルDは、0.0001%海藻抽出物添加を示す。

第9図は、デキストランの添加によるペプチドの移動時間および分解能への影響を示す図である。パネルAは、無添加、パネルBは、0.5%デキストラン添加、パネルCは、1%デキストラン添加、パネルDは、5%デキストラン添加、パネルEは、10%デキストラン添加、パネルFは、5%デキストラン添加を示す。パネルA～Eのデキストランは、平均分子量約100,000～200,000であり、パネルFのデキストランは、平均分子量約60,000～90,000である。

第10図は、SDSの添加によるペプチドの移動時間および分解能への影響を示す図である。パネルAは、無添加、パネルBは、0.01% SDS添加、パネルCは、0.05% SDS添加、パネルDは、0.1% SDS添加、パネルEは、1% SDS添加、パネルFは、5% SDS添加を示す。

第11図は、マイクロチップ電気泳動に用いたマイクロチップの1例を示す図である。1：試料リザーバー、2：ローディングチャネル、3：アウトレット、4：分離用チャネル、5：マイクロチップ基板。

第12図は、マイクロチップ電気泳動におけるローディング条件およびスクイージング条件を検討した結果を示す図である。パネルAは、従来のマイクロチッ

VP法において、低ローディング電圧(100~300V)10~20秒および低スクイージング電圧(100~400V)を負荷した場合の結果の結果を示す。パネルBは、高ローディング電圧(500V)10~20秒および高スクイージング電圧(500V)を負荷した場合の結果を示す。パネルCは、前記VP法に準じて、ローディング電圧およびスクイージング電圧として、共に、100Vを負荷し、泳動前に分離チャネルに50mbarで加圧した場合の結果を示す。パネルDは、前記PP法に準じて、150mbarの加圧でローディングチャネルに試料注入した後、分離チャネルに100mbarで加圧し、スクイージング電圧(100V)を負荷した場合の結果を示す。パネルEは、前記PP法に準じて150mbarの加圧でローディングチャネルに試料注入した後、分離チャネルに150mbarで加圧し、スクイージング電圧(100V)を負荷した場合の結果を示す。なお、それぞれ、泳動電場は、267V/cmとした。

第13図は、通常のキャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動による電気泳動パターンを示す図である。

第14図は、VP法に準じて、2種のタンパク質についてマイクロチップ電気泳動を行なった結果を示す図である。パネルAは、Bovine insulin(MW:5733.5)のみを電気泳動した結果、パネルBは、Myoglobin(MW:16950.9)のみを電気泳動した結果、パネルCは、Bovine insulin(MW:5733.5)とMyoglobin(MW:16950.9)との両方を電気泳動した結果を示す。

第15図は、VP法における工程において、マイクロチップ電気泳動前の加圧時における圧力の影響を調べた結果を示す図である。パネルAは、従来のマイクロチップ電気泳動と同様に加圧を行なわなかった場合の結果、パネルBは、低い加圧(50mbar)を負荷した場合の結果、パネルCは、高い加圧(150mbar)を負荷した場合の結果を示す。

第16図は、VP法により、Bovine insulinとMyosinとをマイクロチップ電気泳動した結果を示す図である。パネルAおよびパネルBは、従来のマイクロチッ

VP法により、Bovine insulinおよびMyosinそれを分離した結果、パネルCは、VP法により、Bovine insulinとMyosinとを分離した結果を示す。

第17図は、VP法およびPP法のそれぞれについて、多糖類 [α -D (+)-Galacturonic acid monohydrate、 β -1,3-Glucan、D-Glucronic acid及び海藻抽出物] の検出における条件を検討した結果を示す図である。パネルAは、従来のマイクロチップ電気泳動において、500Vで20秒の電圧(ローディング電圧)を負荷した結果を示す。パネルBは、従来のマイクロチップ電気泳動において、300Vで10秒の電圧(ローディング電圧)を負荷して行なった結果を示す。パネルCは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、500Vの電場(ローディング電圧)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低い圧力(50mbar)を負荷した場合の結果を示す。パネルDは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧(ローディング電圧)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低い圧力(50mbar)を負荷した場合の結果を示す。パネルEは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧(ローディング電圧)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに中程度の圧力(100mbar)を負荷した場合の結果を示す。パネルFは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧(ローディング電圧)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに高い圧力(150mbar)を負荷した場合の結果を示す。パネルGは、PP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、圧力(150mbar)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低い圧力(50mbar)を負荷した場合の結果を示す。パネルHは、PP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、圧力(150mbar)

bar) を負荷し、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに高い圧力(150 mbar)を負荷した場合の結果を示す

発明を実施するための最良の形態

本発明の分離用担体によれば、キャピラリー電気泳動およびマイクロチップ電気泳動において、操作を簡便にすることことができ、かつ高分子化合物などの解析を高速で行なうことができ、高い分離能を得ることができる。

本明細書においては、高分子化合物としては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸(例えば、DNA、RNAなど)などが挙げられる。

前記核酸は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。

本発明の分離用担体は、キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための分離用担体であり、かつ β -グルカンおよびメチルセルロースからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を含有することに1つの特徴がある。

本発明の分離用担体は、 β -グルカンまたはメチルセルロースを含有しているため、電気泳動時に、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸(DNA、RNAなど)などが、キャピラリー電気泳動に用いられるキャピラリーの壁面またはマイクロチップ電気泳動に用いられるマイクロチップ上のチャネルの壁面に付着することを抑制することができるという優れた効果を発揮する。

前記 β -グルカンは、 β -グリコシド結合を含有したD-グルコースから構成され多糖であればよく、側鎖または直鎖内に β -1, 6結合、 β -1, 4結合を含有した多糖であってもよい。本発明の分離用担体は、 β -グルカンとして、 β -1, 3-グルカンを含む化合物または混合物が挙げられ、例えば、ラミナラン、カードラン、植物抽出物、海藻抽出物、酵母抽出物、真菌抽出物もしくは培養液などが挙げられる。

かかる β -グルカンは、単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いてもよ

い。

前記 β -グルカンは、高い分離能を得、高速分離を達成させる観点から、平均重合度が、2以上、好ましくは、10以上、より好ましくは、20以上であることが望ましく、分離に適した溶解性、粘度、付着性を得る観点から、10000以下、好ましくは、1000以下、より好ましくは、40以下であることが望ましい。

なお、本明細書において、平均重合度は、分子量／モノマー分子量により求められる値を意味する。

β -グルカンの混合物としては、例えば、海藻抽出物、アガリストク、シイタケ、ヒラタケ、ヤマブシタケ、ハナビラタケ、スエヒロタケ、カワラタケなどのキノコ類の抽出物；大麦、カラス麦、オートムギなどの植物の抽出物；パン酵母、ビール酵母、マイコバクテリウム、真菌、糸状菌、クロレラ、微細藻類などの微生物の抽出物またはその培養液などが挙げられる。

前記海藻抽出物は、例えば、文献（特願2000-229369号など）に記載の方法に従って、海藻（ワカメ、コンブ、アラメなど）から得られるものである。具体的には、前記海藻抽出物は、例えば、海藻（ワカメ、コンブ、アラメなど）を、水抽出（熱水、温水、冷水、氷冷水などによる抽出）、各種温度の酸アルカリ抽出、溶媒（エタノール、メタノール、アセトン、エーテルなど）などに供することにより得られうる。

前記海藻抽出物は、例えば、 β -1, 6結合が多い β -1, 3-グルカンである水溶性ラミナラン、 β -1, 6結合が少ない β -1, 3-グルカンである難溶性ラミナランなどの混合物である。

前記メチルセルロースは、分離に適した溶解性、粘度、付着性を得る観点から、平均重合度が、10以上、好ましくは、180以上、より好ましくは、1800以上であることが望ましく、十分な分離度を得る観点から、30000以下、好ましくは、10000以下、より好ましくは、3000以下であることが望ま

しい。

また、前記メチルセルロースは、その誘導体であってもよく、かかる誘導体としては、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシルメチルセルロースなどが挙げられる。

本発明の分離用担体は、電気泳動における泳動用緩衝液に添加して用いることにより、キャピラリー電気泳動およびマイクロチップ電気泳動において、操作を簡便にすることができ、かつ高分子化合物、具体的には、タンパク質、ペプチド、糖鎖、多糖類などの解析を高速で行なうことができ、高い分離能を得ることができる。

したがって、本発明により、前記分離用担体を含有した泳動用緩衝液が提供される。

本発明の泳動用緩衝液は、キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための泳動用緩衝液であり、前記分離用担体を含有することに1つの特徴がある。

かかる泳動用緩衝液によれば、電気泳動時に、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸などの測定試料が、キャピラリー電気泳動に用いられるキャピラリーの壁面またはマイクロチップ電気泳動に用いられるマイクロチップ上のチャネルの壁面に付着することを抑制することができる。したがって、本発明の泳動用緩衝液によれば、高分子化合物の泳動に適し、操作が簡便であり、高速かつ高い分離能を得ることができるキャピラリー電気泳動およびマイクロチップ電気泳動を可能にする。

なお、本明細書において、「測定試料」とは、試料中に含まれる測定対象の物質、すなわち、高分子化合物を意味する。また、単に「試料」と表記した場合、高分子化合物を含有した混合物などを意味する。

本発明の泳動用緩衝液は、高速かつ高い分離能を得る観点から、例えば、測定

試料がペプチドである場合、pH 1.0～12.0、好ましくは、pH 2.0～4.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5M、好ましくは、10 mM～0.5Mの濃度で含有することが望ましい。

本発明の泳動用緩衝液におけるリン酸緩衝液の濃度は、分離能の効果を十分に発揮させる観点から、1 mM以上が好ましく、10 mM以上がより好ましく、50 mM以上がさらに好ましく、75 mM以上がよりさらに好ましく、移動時間を短縮しつつ高い分離能を得る効果を十分に発揮させる観点から、0.5 M以下が好ましく、0.2 M以下がより好ましく、0.1 M以下がさらに好ましい。

前記リン酸緩衝液のpHは、緩衝能、電気泳動における分離能の観点から、1.0～12.0が好ましく、2.0～4.0がより好ましく、2.0～2.8がさらに好ましく、2.5～2.8がよりさらに好ましく、2.5が特に好ましい。

測定試料が、例えば、タンパク質である場合、本発明の泳動用緩衝液は、pH 5.0～11.0、好ましくはpH 7.0～9.6であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5M、好ましくは10 mM～0.15Mの濃度で含有することが望ましい。ここで、本発明の泳動用緩衝液におけるホウ酸緩衝液の濃度は、分離能の効果を十分に発揮する観点から、1 mM以上が好ましく、2.0 mM以上がより好ましく、10 mM以上がさらに好ましく、20 mM以上がよりさらに好ましく、40 mM以上が特に好ましく、移動時間を短縮し、かつ高い分離能を得る効果を十分に発揮させる観点から、0.5 M以下が好ましく、0.15 M以下がより好ましく、0.1 M以下がさらに好ましく、75 mM以下がよりさらに好ましい。前記ホウ酸緩衝液のpHは、緩衝能、電気泳動における分離能の観点から、5.0～11.0が好ましく、7.0～9.5がより好ましく、8.0～9.0がさらに好ましい。

また、測定試料が、例えば、糖類、多糖の場合には、pH 5.0～11.0、好ましくは7.0～9.6であり、1 mM～0.5M、好ましくは10 mM～0

5 M、より好ましくは10 mM～0.15 Mの濃度でトリス-ホウ酸緩衝液を含有した緩衝液であることが望ましい。ここで、本発明の泳動用緩衝液におけるトリス-ホウ酸緩衝液の濃度は、分離能の効果を十分に發揮する観点から、1 mM以上が好ましく、10 mM以上がより好ましく、20 mM以上がさらに好ましく、40 mM以上がよりさらに好ましく、移動時間を短縮し、かつ高い分離能を得る効果を十分に發揮させる観点から、0.5 M以下が好ましく、0.25 M以下がより好ましく、0.15 M以下がさらに好ましく、0.1 M以下がよりさらに好ましく、75 mM以下が特に好ましい。また、前記トリス-ホウ酸緩衝液のpHは、緩衝能、電気泳動における分離能の観点から、5.0～11.0が好ましく、7.0～9.5がより好ましく、8.0～9.0がさらに好ましく、8.0～9.0がよりさらに好ましい。

例えば、測定試料が、核酸の場合、前記10 mM～0.5 M、好ましくは10 mM～0.15 Mのトリス-ホウ酸緩衝液を含有した緩衝液に0.001～0.7重量%、好ましくは0.05～0.7重量%のメチルセルロースを含有していることが望ましい。

分離用担体を含有した泳動用緩衝液における分離用担体の濃度は、用いる化合物の種類により、適宜設定されうるが、例えば、メチルセルロースの場合、分離能向上の観点から、0.001～1.0重量%が好ましく、0.7重量%がより好ましく、0.05～0.5重量%がさらに好ましく、0.1重量%であることが特に好ましい。

分離用担体がカードランである場合、高速分離、分離能向上、測定試料の壁面吸着防止の観点から、0.000001～0.1重量%が好ましく、0.00001～0.01重量%がより好ましく、0.0001～0.001重量%がさらに好ましい。

分離用担体が海藻抽出物である場合、高速分離、分離能向上、測定試料の壁面吸着防止の観点から、0.000001～0.1重量%が好ましく、0.000

0.1～0.001重量%がより好ましく、0.0001重量%であることが特に好ましい。

本発明の泳動用緩衝液により、キャピラリー電気泳動およびマイクロチップ電気泳動に基づく電気泳動法であって、高分子化合物の泳動に適し、操作が簡便であり、高速かつ高い分離能を得ることができる、電気泳動法が提供される。

本発明の電気泳動法としては、具体的には、

(1) キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動において、前記泳動用緩衝液の存在下に、高分子化合物を含有した試料を泳動することを特徴とする方法；

(2) キャピラリー電気泳動において、高分子化合物を含有した試料をキャピラリーにインジェクトし、ついで、加圧し、該試料を、高分子化合物の分離が可能な泳動電場下に泳動することを特徴とする、電気泳動法；

(3) マイクロチップ電気泳動において、

(A) ローディングチャネルと、該ローディングチャネルに交差する分離用チャネルとを備え、かつ該ローディングチャネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップであって、該ローディングチャネルおよび分離用チャネルに泳動用緩衝液が充填されたマイクロチップを用い、

該ローディングチャネルに電圧を負荷、または圧力を加圧して、高分子化合物を含有した試料を該試料リザーバーから供給して、分離用チャネルに導入するステップ【ステップ(A)という】、ならびに

(B) 分離用チャネルを加圧し、ついで、試料を泳動するステップ【ステップ(B)という】

を含むプロセスを行なうことを特徴とする方法
が挙げられる。

本発明の電気泳動法に適用される試料としては、高分子化合物を含有した試料

が挙げられ、具体的には、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（例えば、DNA、RNAなど）などを含有した試料が上げられる。かかる試料は、特に限定されないが、生物由来の試料などが挙げられる。

泳動電場は、キャピラリー電気泳動の場合、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、 $20\text{ V/cm} \sim 10\text{ kV/cm}$ であり、好ましくは、 $50\text{ V/cm} \sim 5\text{ kV/cm}$ であり、より好ましくは $100\text{ V/cm} \sim 1\text{ kV/cm}$ であることが望ましい。

また、泳動電場は、マイクロチップ電気泳動の場合、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、 $20\text{ V/vm} \sim 50\text{ kV/cm}$ であり、好ましくは、 $50\text{ V/cm} \sim 20\text{ kV/cm}$ であり、より好ましくは $100\text{ V/cm} \sim 10\text{ kV/cm}$ であることが望ましい。

前記キャピラリー電気泳動に使用されるキャピラリーにおいて、内径、外径、全長、有効長は、特に限定されるものではなく、特に、有効長に関して、高速での解析を可能にする観点から、短い有効長のキャピラリーを用いることができる。ここで、キャピラリーの有効長とは、試料注入部から検出部の距離をいう。

前記マイクロチップ電気泳動においては、ローディングチャネルと、該ローディングチャネルに交差する分離用チャネルとを備え、かつ該ローディングチャネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップが用いられる。かかるマイクロチップの一例を第11図に示す。第11図中、マイクロチップ基板5上において、ローディングチャネル2と分離用チャネル4とは交差し、該ローディングチャネル2の一端に試料リザーバー1が配置され、他端にアウトレット3が配置されている。

前記マイクロチップ基板の材質としては、例えば、石英ガラス、ホウケイ酸ガラス、ソーダガラス、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ジメチルシロキサンなどが挙げられる。なかでも、試料の吸着が少なく、チップ加工が容易である観点から、ガラス、およびポリメタクリレートが望ましい。

前記マイクロチップの大きさは、例えば、縦10～120mm、横10～120mm、厚さ500～5000μmである。

前記マイクロチップにおけるローディングチャネルおよび分離用チャネルのそれぞれの形状は特に限定されるものではない。

前記チャネルの幅は、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。具体的には、前記チャネルの幅は、十分な解析感度を得る観点から、0.1μm以上、好ましくは10μm以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100μm以下、好ましくは50μm以下であることが望ましい。また、前記チャネルの深さは、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうるが、十分な解析感度を得る観点から、0.1μm以上、好ましくは10μm以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100μm以下、好ましくは50μm以下であることが望ましい。さらに、前記分離用チャネルの長さは、マイクロチップの大きさ、解析対象の化合物に応じて適宜設定することができるが、有効長を、より長くすることが望ましい。有効長は、チャネル交差部から、高分子化合物の検出点（分離用チャネル上に配置）までの距離をいう。十分な分離能を得る観点から、0.1mm以上、好ましくは10mm以上であり、高速分離の観点から、100mm以下、好ましくは50mm以下であることが望ましい。

また、前記リザーバーの大きさは、試料の容量に応じて適宜設定することができる。具体的には、リザーバーの大きさは、試料導入のハンドリング及び電極の太さの観点から、直径0.05mm以上、好ましくは1mm以上であり、用いる試料量の観点から、5mm以下、好ましくは3mm以下であることが望ましい。

マイクロチップ電気泳動において、インジェクションする際の試料の量（濃度）は、良好な分離能を得る観点から、試料が、ペプチドまたはタンパク質の場合、0.1ng/ml～1g/mlであり、好ましくは、10ng/ml～100mg/mlであり、より好ましくは、0.1μg/ml～10mg/mlであることが望ましい。前記試料が、糖または多糖の場合、インジェクションする際の

試料の量（濃度）は、良好な分離能を得る観点から、 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $10\text{ g}/\text{mL}$ であり、好ましくは、 $1\text{ mg}/\text{mL}$ ～ $5\text{ g}/\text{mL}$ であり、より好ましくは、 $100\text{ mg}/\text{mL}$ ～ $1\text{ g}/\text{mL}$ であることが望ましい。前記試料が、核酸の場合、インジェクションする際の試料の量（濃度）は、良好な分離能を得る観点から、 $1\text{ ng}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、好ましくは、 $10\text{ ng}/\text{mL}$ ～ $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、より好ましくは、 $100\text{ ng}/\text{mL}$ ～ $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ であることが望ましい。

前記（1）の電気泳動法においては、電気泳動時の泳動電圧などは、解析対象の化合物（タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（例えば、DNA、RNAなど）など）により適宜設定されうる。かかる泳動電圧は、例えば、試料の分離能、用いる泳動用緩衝液の粘度、試料中に含まれる試料数などにより決定されうる。

前記（2）の電気泳動法としては、具体的には、キャピラリー電気泳動において、

（a）試料注入口とアウトレットとを備え、かつ泳動用緩衝液が充填されたキャピラリーの試料注入口から、電圧の負荷、または加圧により試料をインジェクトするステップ〔ステップ（a）という〕、および

（b）水または緩衝液を用いて加圧し、ついで、試料を泳動するステップ〔ステップ（b）という〕

を含むプロセスを行なう方法が挙げられる。

ここで、泳動用緩衝液としては、pH 1.0～12.0、好ましくはpH 2.0～4.0である 10 mM ～ 0.5 M リン酸緩衝液、pH 5.0～11.0、好ましくは7.0～9.5である 10 mM ～ 0.5 M 、好ましくは 10 mM ～ 0.15 M のホウ酸緩衝液、pH 5.0～11.0、好ましくは7.0～9.5である 10 mM ～ 0.5 M 、好ましくは 10 mM ～ 0.15 M のトリス-ホウ酸緩衝液、本発明の分離用担体を含む泳動用緩衝液などが挙げられる。解析を高速で

行ない、かつ高い分離能を得る観点から、本発明の分離用担体を含む泳動用緩衝液が好ましい。

前記ステップ（a）においては、解析を高速で行ない、かつ高い分離能を得る観点から、キャピラリーのアウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、試料をインジェクトすることが好ましい。

前記ステップ（a）における電気的注入としては、試料をキャピラリーにインジェクトするに適した電場の負荷が挙げられる。

前記ステップ（b）においては、みかけの有効長を短くするに適した圧力の負荷が挙げられ、試料中の高分子化合物を分離するに適した泳動電圧下に泳動する。前記ステップ（b）における泳動電圧は、解析対象の化合物（タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（例えば、DNA、RNAなど）など）、試料の分離能、用いる泳動用緩衝液の粘度、試料中に含まれる試料数により決定されうる。

前記（2）の電気泳動法は、具体的には、例えば、ステップ（a）において、電圧1～30kV、好ましくは5～15kVで1～30秒、好ましくは5～15秒でインジェクトすることにより、該試料をキャピラリーにインジェクトすること、および

ステップ（b）において、水または緩衝液を2～50mbar、2～30秒で加圧して、20V/cm～50kV/cmの泳動電場下に分離することにより実施されうる。

また、試料注入条件、加圧条件は、装置の種類および性能、インジェクト部分の形状、サンプルバイアルの形および大きさ、サンプルキャップの材質および形状、試料粘度、濃度などに応じて適宜設定される。

前記（3）の電気泳動法としては、具体的には、ステップ（A）において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、ローディングチャネルに電圧を負荷することにより、試料を該分離用チ

チャネルに導入し、

ステップ（B）において、分離用チャネルを加圧し、ついで、ローディングチャネルを加圧し、かつ分離用チャネルに電圧を負荷することにより、試料を泳動するプロセス〔プロセス1という〕；

または

ステップ（A）において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、試料リザーバーを加圧して、高分子化合物を含有した試料を分離用チャネルに導入し、

ステップ（B）において、分離用チャネルを加圧し、ついで、試料を泳動するプロセス〔プロセス2という〕

を行なう方法が挙げられる。

前記（3）の方法によれば、前記ステップを行なうため、分子量9～205kDaのタンパク質を15秒以内に分離することができ、2～100個の単糖を構成糖として有する糖を15秒以内に分離することができ、10塩基～10キロ塩基のDNAを50秒以内に分離することができるという優れた効果が発揮される。

前記プロセス1においては、前記ステップ（A）においては、導入する試料及び用いる緩衝液粘度に適した電圧（もしくは電場）により負荷する。

具体的には、ステップ（A）において、ローディングチャネルに100～500Vの電圧を負荷し、

ステップ（B）において、分離用チャネルを1～1520mbar、好ましくは10～760mbarで加圧し、ついで、ローディングチャネルに100～500Vの電圧を負荷し、かつ分離用チャネルに20V/cm～50kV/cmの電場を負荷する。

前記ステップ（B）における加圧の際の圧力の大きさを調節することにより、分離能を調整することができる。

一方、プロセス2においては、前記ステップ(A)における加圧としては、導入する試料および緩衝液の粘度に適した圧力が挙げられる。

具体的には、ステップ(A)において、試料リザーバーに、圧力(1~1520 mbar、好ましくは50~760 mbar)を加圧し、

ステップ(B)において、分離用チャネルに、1~1520 mbar、好ましくは10~760 mbarの加圧し、ついで、20V~50kV/cmの電場を負荷する。

前記ステップ(B)における加圧の際の圧力の大きさを調節することにより、分離能を調整することができる。

したがって、本発明の電気泳動法に用いる装置には、加圧装置が備えられていることが望ましい。本発明には、本発明の電気泳動法に用いるに適した電気泳動装置も含まれる。かかる装置としては、キャピラリーもしくはマイクロチップ；該キャピラリーもしくはマイクロチップを保持する手段；該キャピラリーもしくはマイクロチップに電場または電圧を負荷する手段；該キャピラリーもしくはマイクロチップに圧力を加圧する手段；これらの手段に適した電力を供給するための電源；変圧器；電場または電圧または圧力を制御する手段(コンピュータなど)；該キャピラリーもしくはマイクロチップに試料を注入する手段などを備えた装置などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明の電気泳動法により、簡便、かつ迅速に、高い分離能を得ることができ、プロテオーム解析、グライコーム解析などへの応用が可能な、高分子化合物の解析方法が提供される。かかる解析方法は、高分子化合物を含有した試料を泳動して、該高分子化合物を分離し、分離された高分子化合物を検出して移動度を測定することを1つの特徴とする。

本発明の解析方法においては、試料中の高分子化合物は、例えば、UV波長光による吸収、蛍光、レーザー、ランプ、LEDなどによる検出、電気化学的検出、化学発光検出を測定することにより検出されうる。具体的には、高分子化合物が

、タンパク質またはペプチドの場合、200 nmにおける吸収を測定すること；SYPRO Orangeとタンパク質またはペプチドとを反応させ、460～550 nmで励起させ、550～650 nmで蛍光を測定すること、および電気化学的測定、化学発光測定などにより、タンパク質またはペプチドを検出することができる。また、高分子化合物が、糖鎖または多糖類の場合、260 nmまたは280 nmにおける吸収を測定すること；SYPRO Orangeと糖鎖または多糖類とを反応させ、蛍光測定、および電気化学的測定、化学発光測定などにより、糖鎖または多糖類を検出することができる。

前記キャピラリー電気泳動においては、例えば、キャピラリーのアウトレットに、UV波長光を発しうる装置と該UV波長光の検出器とを設置してもよく、あるいは蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。

前記マイクロチップ電気泳動においては、例えば、分離用チャネル上に配置された検出点にUV波長光の検出器を設置してもよく、あるいは、蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。

検出の際、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類、核酸（DNA、RNAなど）などの同定を行なう場合には、UV吸収、標品との移動時間の比較、マススペクトルの解析などにより行なうことができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

製造例 1

文献【例えば、特願2000-229369号など】に記載の方法に従い、ワカメ（胞子葉または茎または根または葉状体を含む）、コンブ、アラメなどの海藻類を熱水抽出し、抽出物を得た。

ついで、前記抽出物を、脱イオン水に溶解した。得られた溶液を、キャピラリー電気泳動に供し、抽出物の組成を解析した。

なお、キャピラリー電気泳動には、Hewlett Packard社製HP 3DCEシステムを用いた。また、キャピラリーとして、ジフェニル ジメチルポリシロキサンにより内壁がコーティングされたDB-17キャピラリー〔内径0.1mm、外径0.36mm、全長32.5cm、有効長24cm; J&W Scientific社製〕を用いた。検出は、フォトダイオードアレイにより、260nmおよび280nmで行なった。

キャピラリー電気泳動の条件は、キャピラリー温度：25°C、電場：200または300V/cm、注入条件：5kVで5秒である。

その結果、電場300V/cmの場合、移動時間3.5～4分において、260nmに最大吸収波長度を呈する画分1と、移動時間4～6分において、280nmに最大吸収波長度を呈する画分2とが得られた。

また、標品との比較に基づき、前記画分1は、 β -1, 6結合を含む β -1, 3-グルカンを主成分とした水溶性ラミナランであり、前記画分2は、ガラクトースまたはウロン酸を含有した多糖であることが示された。

実施例1

キャピラリー電気泳動における泳動条件を検討した。

バイオラッドラボラトリーソ製のペプチド標品 (Bardykinin (MW: 1,060), Angiotensin II (MW: 1,046), α -Melanocyte stimulating hormone (MW: 1,665), Thyrotropin releasing hormone (MW: 362), Luteinizing hormone releasing hormone (MW: 1,182), Bombesin (MW: 1,629), Leucine enkephalin (MW: 392), Methionine enkephalin (MW: 574), Oxytocin (MW: 1,007)) を、最終濃度50 μ g/mlとなるように脱イオン水 (ICNバイオメディカルズインコーポレティド製) に溶解した。得られた溶液を、以下、ペプチド試料として用いた。

キャピラリー電気泳動には、Hewlett Packard社製HP^{3D}CEシステムを用いた。また、キャピラリーとして、ジフェニル ジメチル ポリシリコサンにより内壁がコーティングされたDB-17キャピラリー〔内径0.1mm、外径0.36mm、全長32.5cm、コーティング相の厚さ0.1μm; J&W Scientific社製〕を用いた。ペプチドの検出は、200nmの吸収を指標として行なった。キャピラリー電気泳動の条件は、方法:CZE、電極の設定:陽極-陰極、キャピラリー温度:25°C、泳動:10kVである。また、電気泳動用緩衝液として、0.1Mリン酸緩衝液(pH 2.5)を用いた。

まず、試料注入時における条件および泳動時における泳動電圧の条件について検討した。試料注入については、5~8kVで5~8秒で検討を行ない、泳動電圧については、5~15kVで検討を行なった。第1図に、有効長24cmのキャピラリーにおける移動時間およびペプチドの分離に対する試料注入条件および泳動電圧の影響を調べた結果を示す。

その結果、パネルDおよびパネルEに示すように、8kVで8秒での試料注入により、十分な強度が得られることが示された。

シャープなピークを得、良好な分離能を得、かつ移動時間を短くする観点から、8kVで8秒での試料注入を行ない、10kVの泳動電圧により、電気泳動を行なう条件が、最も適していることが示唆された。

また、5kVで5秒での試料注入と、6.5kVの泳動電圧により、電気泳動を行なう条件、8kVで8秒の試料注入と15kVの泳動電圧によっても十分な強度が得られた。

前記結果を基に、キャピラリーの有効長について、有効長24cmまたは8.5cmのキャピラリーを用いて検討を行なった。第2図に、移動時間およびペプチドの分離に対するキャピラリーの有効長への影響を調べた結果を示す。

その結果、有効長8.5cmのキャピラリーを用いた場合においても、24c

mのキャピラリーを用いた場合の分離能を損なうことなく、移動時間を短縮できることが示された。

実施例 2

試料注入後に加圧することによる、移動時間の短縮効果を調べた。具体的には、水もしくは緩衝液を試料注入口またはアウトレットにセッティングした条件下あるいは水もしくは緩衝液を試料注入口またはアウトレットにセッティングしない条件下に、試料注入を行ない、ついで、加圧した場合 (10 mbar、8秒)、あるいは加圧しない場合における試料の移動時間および分離能を調べた。なお、試料として、前記実施例1におけるペプチド試料を用いた。結果を、第3図に示す。

パネルAは、従来より行なわれてきた方法（試料注入後に加圧しない場合）による電気泳動のパターンを示す。パネルBは、試料注入後に、加圧 (1.0 mbar、8秒) する条件であり、試料注入を、キャピラリーのアウトレットにリン酸緩衝液 (pH 2.5) をセッティングして行なった結果を示す。また、パネルCは、試料注入後に、加圧 (1.0 mbar、8秒) する条件であり、試料注入を、キャピラリーのアウトレットにリン酸緩衝液 (pH 2.5) をセッティングせずに行なった結果を示す。

その結果、試料注入を、キャピラリーのアウトレットに緩衝液をセッティングせずに行ない、試料注入後に、加圧する条件において、良好な分離能を得ることができ、かつ移動時間を短縮できることが示された。

さらに、キャピラリーのアウトレットに緩衝液をセッティングした条件下に試料注入を行ない、ついで、水もしくは緩衝液を試料注入口またはアウトレットにセッティングした条件あるいは水もしくは緩衝液を試料注入口またはアウトレットにセッティングしない条件において、10 mbarで6～8秒の加圧した場合における分離能および移動時間を調べた。その結果を第4図に示す。

パネルAは、試料注入後に、加圧しない従来の条件による結果を示す。また、パネルB～Dは、試料注入を、キャピラリーのアウトレットに緩衝液をセッティングせずに行ない、キャピラリーの試料注入口に水をセッティングした条件下に加圧した場合の結果を示す。また、パネルEは、試料注入を、キャピラリーのアウトレットに緩衝液をセッティングせずに行ない、キャピラリーの試料注入口に緩衝液をセッティングした条件下に圧力をかけた場合の結果を示す。なお、各加圧条件を以下に示す。

パネルBにおける条件

試料注入後、10 mbarで6秒の加圧、試料注入口：水、アウトレット：緩衝液なし

パネルCにおける条件

試料注入後、10 mbarで6秒の加圧、試料注入口：水、アウトレット：水

パネルDにおける条件

試料注入後、10 mbarで8秒の加圧、試料注入口：水、アウトレット：緩衝液

パネルEにおける条件

試料注入後、10 mbarで7秒の加圧、試料注入口：緩衝液、アウトレット：緩衝液

その結果、第4図のパネルDに示すように、前記第3図のパネルCと同じ条件下において、移動時間が短縮され、良好な分離を得ることができる事が示された。

さらに、第4図のパネルDにおける条件において、加圧時間による移動時間および分離能への影響を検討した。その結果の一部を第5図に示す。

なお、加圧条件は、パネルA：10 mbarで2秒、パネルB：10 mbarで6秒、パネルD：10 mbarで8秒である。

第5図に示すように、6秒を超える加圧時間（7～8秒）により、シャープなピークが得られることがわかる。

実施例3

試料注入を、有効長8.5cmのキャピラリーのアウトレットにリン酸緩衝液（pH 2.5）をセッティングせずに行ない、ついで、加圧（10mbar、8秒）する条件において、泳動用緩衝液に、 β -1, 3-ケルカン（カードラン）を分離用担体として添加した系（終濃度0.0001重量%）を用いて、移動時間、分離能への影響を調べた。なお、試料として、前記実施例1におけるペプチド試料を用いた。

その結果、第6図に示すように、0.0001重量% カードランを分離用担体として用いた場合、分離用担体を用いない場合に比べ、よりピークがシャープになり、かつ短時間での分離が可能になることがわかる。

有効長24cmのキャピラリーでは、ペプチドの解析に25分かかるが、0.0001重量% カードランを分離用担体として用いる方法によれば、有効長8.5cmのキャピラリーにより5分でペプチドを解析することができ、かつ良好な分離能を得ることができる。

実施例4

キャピラリー電気泳動により、タンパク質を解析するに適した電気泳動用緩衝液の検討を行なった。

電気泳動用緩衝液として、0.5～0.1Mの範囲の濃度の緩衝液（リン酸緩衝液（pH 2.5）、ホウ酸緩衝液（pH 5.5）またはトリス-ホウ酸緩衝液（pH 8.5））を用い、タンパク質試料の分離の至適条件を検討した。

キャピラリー電気泳動には、Hewlett Packard社製HP^{3D}CEシステムを用いた。また、キャピラリーとして、ジフェニルジメチルポリシ

ロキサンにより内壁がコーティングされたDB-17キャピラリー〔内径0.1mm、外径0.36mm、全長32.5cm、有効長24cm; J&W Scientific社製〕を用いた。ペプチドの検出は、200nmの吸収を指標として行なった。キャピラリー電気泳動の条件は、方法: CZE、電極の設定: 陽極-陰極、キャピラリー温度: 25°C、泳動: 10kVである。

試料として、実施例1に記載のペプチド試料を用いた。

その結果、0.1M以下の濃度のリン酸緩衝液(pH 2.5)を用いた場合、移動時間の短縮および分離能の向上が認められた。

実施例5

分離用担体として、メチルセルロース〔平均分子量: 約400,000、シグマ社製〕、デキストラン〔平均分子量: 約100,000~200,000および平均分子量60,000~90,000、いずれも和光純薬社製〕、カードラン〔和光純薬社製〕、ドテシル硫酸ナトリウム(SDS、和光純薬社製)、アルギン酸ナトリウム(ナカライトスク社製)および前記製造例1で得られた海藻抽出物のそれぞれを用い、タンパク質、ペプチド試料の分離のための至適条件を検討した。

キャピラリー電気泳動には、Hewlett Packard社製HP^{3D}CEシステムを用いた。また、キャピラリーとして、ジフェニルジメチルポリシロキサンにより内壁がコーティングされたDB-17キャピラリー〔内径0.1mm、外径0.36mm、全長32.5cm、有効長24cm; J&W Scientific社製〕を用いた。ペプチドの検出は、200nmの吸収を指標として行なった。キャピラリー電気泳動の条件は、方法: CZE、電極の設定: 陽極-陰極、キャピラリー温度: 25°C、泳動: 10kVである。また、電気泳動用緩衝液として、75mM リン酸緩衝液(pH 2.5)を用いた。試料として、実施例1に記載のペプチド試料を用いた。結果を第7図~第10図に示す。

その結果、0.1重量% メチルセルロースの添加（第7図のパネルC）、0.0001～0.001重量% カードランの添加（第8図のパネルBおよびC）および0.0001重量% 海藻抽出物の添加（第8図のパネルD）により、移動時間の短縮および良好な分離能を得ることができることが示された。

実施例 6

マイクロチップ電気泳動における泳動条件を検討した。

マイクロチップ電気泳動には、LED検出器を備えたマイクロチップ電気泳動装置〔SV1100、日立電子工業社製〕を、マイクロチップにおけるタンパク質分離の評価に用いた。マイクロチップとして、DNA解析用に開発されたi-chipキットのマイクロチップ（日立化成工業社製）を用いた。前記マイクロチップは、ポリ（メチルメタクリラート）（PMMA）から製造されたものであり、幅50μm、深さ30μm、長さ8mmのローディングチャネルと幅50μm、深さ30μm、長さ30mmの分離用チャネルとリザーバーとを有する（第11図参照のこと）。

マイクロチップ電気泳動の手順を以下に示す。

①VP法

前記チャネルを、緩衝液および試料で満たした。ついで、アウトレット（第11図中、3に該当）に泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、10～500Vの電圧（ローディング電圧）10～60秒を負荷して、試料をインジェクトした。分離用チャネルに圧力（1～520mbar）を負荷した後、10～500Vの電圧（スクリージング電圧）および300～900Vの電圧（泳動電圧）（100～300V/cmの電場）を負荷して電気泳動を行ない、試料を分離した。

②PP法

前記VP法において、電圧による試料の分離用チャネルへのインジェクシ

ヨンの代わりに、圧力（1～15.20 mbar）を負荷することにより、試料のインジェクションを行なった。さらに、分離用チャネルに圧力（1～15.20 mbar）を負荷した後、300～900 Vの電圧（泳動電圧）（100～300 V/cmの電場）を負荷して電気泳動を行ない、試料を分離した。

③従来のマイクロチップ電気泳動

前記チャネルおよびウェルを、緩衝液および試料で満たした。100～500 Vの電圧をローディングチャネルに20秒負荷した。ついで、マイクロチップの交差部に100～500 Vの電圧を負荷し、分離チャネルに300～900 Vの電圧（泳動電圧）（10.0～300 V/cmの電場）を負荷し、それにより試料を分離した。

（1）タンパク質の検出

タンパク質標品として、Lysozyme (MW: 14,400)、Trypsin inhibitor (MW: 21,500)、Carbonic anhydrorase (MW: 31,000)、Ovalbumin (MW: 45,000)、Serum albumin (MW: 66,200)、Phosphorylase B (MW: 97,000)、 β -Galactosidase (MW: 116,000)、Myosin (MW: 200,000)（以上、バイオラッドラボラトリ－社製）を用いた。前記タンパク質標品を、それぞれ脱イオン水に溶解し、終濃度0.3 μ g～7.5 mg/mlのタンパク質溶液を得た。

タンパク質の電気泳動用緩衝液として、0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.3) を用いた。

また、マイクロチップにおいて、1 μ lのSYPRO Orangeを10 μ lのタンパク質溶液と反応させた。タンパク質は、220 nmにおける吸収により検出した。

その結果を第12図に示す。第12図において、パネルAは、従来のマイクロチップ電気泳動において、低ローディング電圧（100～300 V）10～20

秒および低スケイジング電圧（100～400V）を負荷した場合の結果を示す。パネルBは、高ローディング電圧（500V）10～20秒および高スケイジング電圧（500V）を負荷した場合の結果を示す。パネルCは、前記VP法に準じて、ローディング電圧およびスケイジング電圧として、共に、100Vを負荷し、泳動前に分離チャネルに50mbarで加圧した場合の結果を示す。パネルDは、前記VP法に準じて、8種類のタンパク質の混合物について解析した結果である。具体的には、パネルDは、150mbarの加圧でローディングチャネルに試料注入した後、分離チャネルに100mbarで加圧し、スケイジング電圧（100V）を負荷した場合の結果を示す。かかるパネルDにおいて、各ピークは以下の通りである。1: Lysozyme、2: Trypsin inhibitor、3: Carbonic anhydrase、4: Ovalbumin、5: Serum albumin、6: Phosphorylase、7: β -Galactosidase、8: Myosin。パネルEは、前記PP法に準じて、150mbarの加圧でローディングチャネルに試料注入した後、分離チャネルに150mbarで加圧し、スケイジング電圧（100V）を負荷した場合の結果を示す。なお、それぞれ、泳動電圧は、800V（267V/cmの電場）とした。

その結果、従来のマイクロチップ電気泳動においては、タンパク質のピークを分離することができなかつたが、前記VP法およびPP法によれば、良好な分離能を得ることができた。

特に、パネルDに示すPP法によれば、分離能を自在に変えることができるため、ピーク数が多い場合にも良好に検出できた。

さらに、パネルEに示すPP法によれば、9～205kDaのタンパク質を分離することができ、15秒以内に分離することができた。

また、キャピラリー電気泳動により、同じ試料を分離した場合〔第13図を参照のこと〕に比べ、前記VP法およびPP法によれば、操作に要する時間を短縮することができた。

なお、かかるキャピラリー電気泳動には、Hewlett Packard社

製HP^{3D}CEシステムを用い、キャピラリーとして、ジフェニルジメチルポリシリコサンにより内壁がコーティングされたDB-17キャピラリー〔内径0.1mm、外径0.36mm、全長32.5cm、有効長24cm; J&W Scientific社製〕を用い、ペプチドの検出は、200nmの吸収を指標として行なった。キャピラリー電気泳動の条件は、方法: CZE、電極の設定: 陽極-陰極、キャピラリー温度: 25°C、泳動: 10kVである。

(2) マイクロチップ電気泳動の分離工程における2種のタンパク質間の相互作用への影響

Bovine insulin (MW: 5733.5) とMyoglobin (MW: 16950.9) と〔共にシグマ社製〕を用い、前記VP法に準じて、アウトレット〔第11図中3〕に泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、100~500Vの電場（ローディング電圧）を負荷して、試料をインジェクトし、マイクロチップ電気泳動を行なった。その結果を第14図に示す。

かかる条件下では、パネルAおよびBにおけるBovine insulinおよびMyoglobinそれぞれの移動度と、パネルCに示す2種のタンパク質のそれぞれの移動度とが同一であることがわかる。これにより、前記条件下には、タンパク質間の相互作用によった移動度変化は認められないことが示される。

(3) VP法における電気泳動前の加圧による移動時間の短縮効果

前記VP法における工程において、電気泳動前の加圧時における圧力〔加圧なし、低い加圧、より強い加圧〕の影響を調べた。結果を第15図に示す。

パネルAは、従来のマイクロチップ電気泳動と同様に加圧を行なわなかった場合の結果を示す。また、パネルBは、低い加圧(50mbar)を負荷した場合の結果を示し、パネルCは、より強い加圧(150mbar)を負荷した場合の結果を示す。

その結果、加圧により、移動時間が短縮できることが示された。また、より強い加圧（150 mbar）を負荷した場合、ベースラインの乱れが低減することが示された。

(4) 2種のタンパク質の分離

前記VP法により、Bovine insulinとMyosinとを電気泳動した。結果を第16図に示す。

パネルAおよびパネルBは、従来のマイクロチップ電気泳動により、Bovine insulinおよびMyosinそれぞれを分離した結果を示す。また、パネルCは、前記VP法により、Bovine insulinとMyosinとを分離した結果を示す。

かかる結果および前記第14図において、VP法によりタンパク質間の相互作用による移動度変化がないことにより、前記VP法により、両方のタンパク質の移動時間が短縮できることが示された。

(5) 多糖類の検出

以下、多糖標品として、 α -D(+)-Galacturonic acid monohydrate、 β -1,3-Glucan(カードラン)〔以上、和光純薬社製〕、D-Glucuronic acid〔ナカライトスク社製〕を用いた。また、前記製造例1により得られた海藻抽出物を多糖類の天然試料として用いた。前記多糖を、それぞれ脱イオン水に溶解し、1～2M多糖溶液を得た。

多糖類の電気泳動用緩衝液として、0.1Mトリス-ホウ酸緩衝液(pH 8.5)を用いた。また、マイクロチップ中において、また、 $1\mu l$ のSYPRO Orangeを $20\mu l$ の多糖溶液と反応させた。多糖は、260 nmまたは280 nmの吸収により検出した。

前記VP法およびPP法のそれぞれについて、前記多糖類の検出における条件を検討した。なお、対照として、従来のマイクロチップ電気泳動により多糖類の

検出を行なった。結果を第17図に示す。

パネルAは、従来のマイクロチップ電気泳動において、500Vで20秒の電圧（ローディング電圧）を負荷した条件により行なった結果を示す。パネルBは、従来のマイクロチップ電気泳動において、300Vで10秒の電圧（ローディング電圧）を負荷して行なった結果を示す。これらのように、従来の方法によれば、ピークを検出できなかった。

パネルCは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、500Vの電圧（ローディング電圧）20秒を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低い圧力（50mbar）を負荷した場合の結果を示す。

パネルDは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧（ローディング電圧）20秒を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低圧力（50mbar）を負荷した場合の結果を示す。

パネルEは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧（ローディング電圧）20秒を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに中程度の圧力（100mbar）を負荷した場合の結果を示す。

パネルFは、VP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、300Vの電圧（ローディング電圧）20秒を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに高圧力（150mbar）を負荷した場合の結果を示す。

パネルGは、PP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、圧力（150mbar）を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに低圧力（50mbar）を負荷した場合の結果を示す。

パネルHは、PP法において、アウトレットに泳動用緩衝液がない条件下に、ローディングチャネルに、圧力(150 mbar)を負荷して、試料をインジェクトし、ついで、分離用チャネルに高圧力(50 mbar)を負荷した場合の結果を示す。

それぞれの泳動電圧は、800V(267V/cmの電場)とした。その結果、パネルHにおける条件下において、より移動時間を短縮することができ、かつ良好な分離能を得ることができることが示された。

(6) DNAの検出

0.1 μg～500 μg/μlのDNA(大きさ10 kbのラダー(フナコシ社製)]溶液を試料とした。10 mM～0.15 Mのトリス-ホウ酸緩衝液(pH 7.0～10.0)を含有した緩衝液に0.01～1.0重量%のメチルセルロースを含有した溶液を泳動用緩衝液として用い、前記(5)におけるVP法、PP法に準じて、マイクロチップ電気泳動を行なった。

その結果、従来のマイクロチップ電気泳動では、移動時間が10キロ塩基に対し、最短で170秒であるのに対し、VP法およびPP法によれば、約50秒であり、より移動時間を短縮することができ、かつ良好な分離能を得ることができることが示された。

産業上の利用可能性

本発明の電気泳動法および高分子化合物の解析方法によれば、迅速に、高い分離能を得ることができるため、遺伝子の解析、プロテオーム解析またはゲライコーム解析におけるタンパク質または糖鎖のHigh Through-putスクリーニング解析に有用であり、医療診療装置への応用、および生体機能、疾患発症機構などの解明への応用が期待される。

請求の範囲

1. β -グルカンおよびメチルセルロースからなる群より選ばれた1種の化合物を含有してなる、キャビラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための分離用担体。
2. β -グルカンとして、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含むラミナラン、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含むカードラン、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含む植物抽出物、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含む海藻抽出物、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含む酵母抽出物、 $\beta-1, 3$ -グルカンを含む真菌抽出物および $\beta-1, 3$ -グルカンを含む真菌培養液からなる群より選ばれた少なくとも1種を含有してなる、請求項1記載の分離用担体。
3. β -グルカンとして、 $\beta-1, 3$ -を含むグルカン海藻抽出物を含有してなる、請求項1記載の分離用担体。
4. 海藻抽出物が、原藻を、水抽出、酸アルカリ抽出および溶媒抽出からなる群より選ばれた1種の抽出法により処理することにより得られた抽出物である、請求項3記載の分離用担体。
5. 請求項1～4いずれか1項に記載の分離用担体を含有してなる、キャビラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動に用いるための泳動用緩衝液。
6. 下記(1)～(3)：
下記(1)～(3)：
(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含

有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、および

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリスーホウ酸緩衝液を含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつメチルセルロースを0.01～0.5重量%の濃度で含有してなる、請求項5記載の泳動用緩衝液。

7. 下記(1)～(4)：

(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリスーホウ酸緩衝液を含有した緩衝液

(4) 前記(3)において、0.001～1.0重量%のメチルセルロースをさらに含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつカードランを0.00001～0.1重量%の濃度で含有してなる、請求項5記載の泳動用緩衝液。

8. 下記(1)～(4)：

(1) pH 1.0～12.0であるリン酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(2) pH 5.0～11.0であるホウ酸緩衝液を1 mM～0.5 Mの濃度で含有した緩衝液、

(3) pH 5.0～11.0であり、1 mM～0.5 Mの濃度でトリスーホウ酸

緩衝液を含有した緩衝液

(4) 前記(3)において、0.001～1.0重量%のメチルセルロースをさらに含有した緩衝液

からなる群より選ばれた1種の緩衝液であって、かつ海藻抽出物を0.000001～0.1重量%の濃度で含有してなる、請求項5記載の泳動用緩衝液。

9. キャピラリー電気泳動またはマイクロチップ電気泳動において、請求項5～8いずれか1項に記載の泳動用緩衝液の存在下に、高分子化合物を含有した試料を泳動することを特徴とする、電気泳動法。

10. 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、請求項9記載の電気泳動法。

11. キャピラリー電気泳動において、高分子化合物を含有した試料をキャピラリーにインジェクトし、ついで、加圧し、該試料を、高分子化合物の分離が可能な泳動電場下に泳動することを特徴とする、電気泳動法。

12. 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、請求項11記載の電気泳動法。

13. キャピラリー電気泳動において、

(a) 試料注入口とアウトレットとを備え、かつ泳動用緩衝液が充填されたキャピラリーの試料注入口から、加圧または電気的注入により試料をインジェクトするステップ〔ステップ(a)という〕、および

(b) 加圧し、ついで、試料を泳動するステップ〔ステップ(b)という〕を含むプロセスを行なう、請求項11または12記載の電気泳動法。

14. ステップ(a)において、キャピラリーのアウトレットに水または泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、該試料をキャピラリーにインジェクトし、ステップ(b)において水または緩衝液を加圧する、請求項13記載の電気泳動法。

15. ステップ(a)において、1~30kV、1~30秒での電気的注入により、該試料をキャピラリーにインジェクトし、ステップ(b)において、20V/cm~10kV/cmの泳動電場下に泳動する、請求項13または14記載の電気泳動法。

16. ステップ(a)において、1~30kV、1~60秒での電気的注入により、該試料をキャピラリーにインジェクトし、ステップ(b)において、2~50mbar、2~30秒で加圧する、請求項13または14記載の電気泳動法。

17. 請求項5~8いずれか1項に記載の泳動用緩衝液の存在下に、試料を泳動する、請求項11~16いずれか1項に記載の電気泳動法。

18. マイクロチップ電気泳動において、

(A) ローディングチャネルと、該ローディングチャネルに交差する分離用チャネルとを備え、かつ該ローディングチャネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップであって、該ローディングチャネルおよび分離用チャネルに泳動用緩衝液が充填されたマイクロチップを用い、

該ローディングチャネルに電圧又は圧力を負荷して、高分子化合物を含有した試

料を該試料リザーバーから供給して、分離用チャネルに導入するステップ【ステップ（A）という】、ならびに
（B）分離用チャネルを加圧し、ついで、該試料を泳動するステップ【ステップ（B）という】
を含むプロセスを行なうことを特徴とする、電気泳動法。

19. 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖類および核酸からなる群より選ばれた1種である、請求項18記載の電気泳動法。

20. ステップ（B）における加圧の際の圧力の大きさを調節することにより、分離能を調整する、請求項18または19記載の電気泳動法。

21. ステップ（A）において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティングしない条件下に、ローディングチャネルを電圧を負荷することにより、試料を該分離用チャネルに導入し、

ステップ（B）において、ローディングチャネルに電圧を負荷し、かつ分離用チャネルを電圧を負荷することにより、試料を泳動する、請求項18～20いずれか1項に記載の電気泳動法。

22. ステップ（A）において、ローディングチャネルに10～500Vの電圧（ローディング電圧）2～60秒）を負荷し、
ステップ（B）において、ローディングチャネルに10～500Vの電圧（スクイージング電圧）を負荷し、かつ分離用チャネルに20V/cm～50kV/cmの電場を負荷する、請求項21記載の電気泳動法。

23. ステップ（A）において、アウトレットに泳動用緩衝液をセッティング

しない条件下に、試料リザーバーを加圧することにより、試料を該分離用チャネルに導入し、

ステップ（B）において、分離用チャネルを加圧し、ついで、試料を泳動する、請求項18～20いずれか1項に記載の電気泳動法。

24. ステップ（A）において、試料リザーバーに1～1520 mbarの圧力を加圧し、

ステップ（B）において、分離用チャネルに1～1520 mbarの加圧後、20 V/cm～50 kV/cmの電場を負荷する、請求項23記載の電気泳動法。

25. 分子量9～205 kDaのタンパク質を15秒以内に分離する、請求項18～24いずれか1項に記載の電気泳動法。

26. 2～100個の単糖を構成糖として有する糖を15秒以内に分離する、請求項18～24いずれか1項に記載の電気泳動法。

27. 10塩基～10キロ塩基の核酸を50秒以内に分離しうる、請求項18～24いずれか1項に記載の電気泳動法。

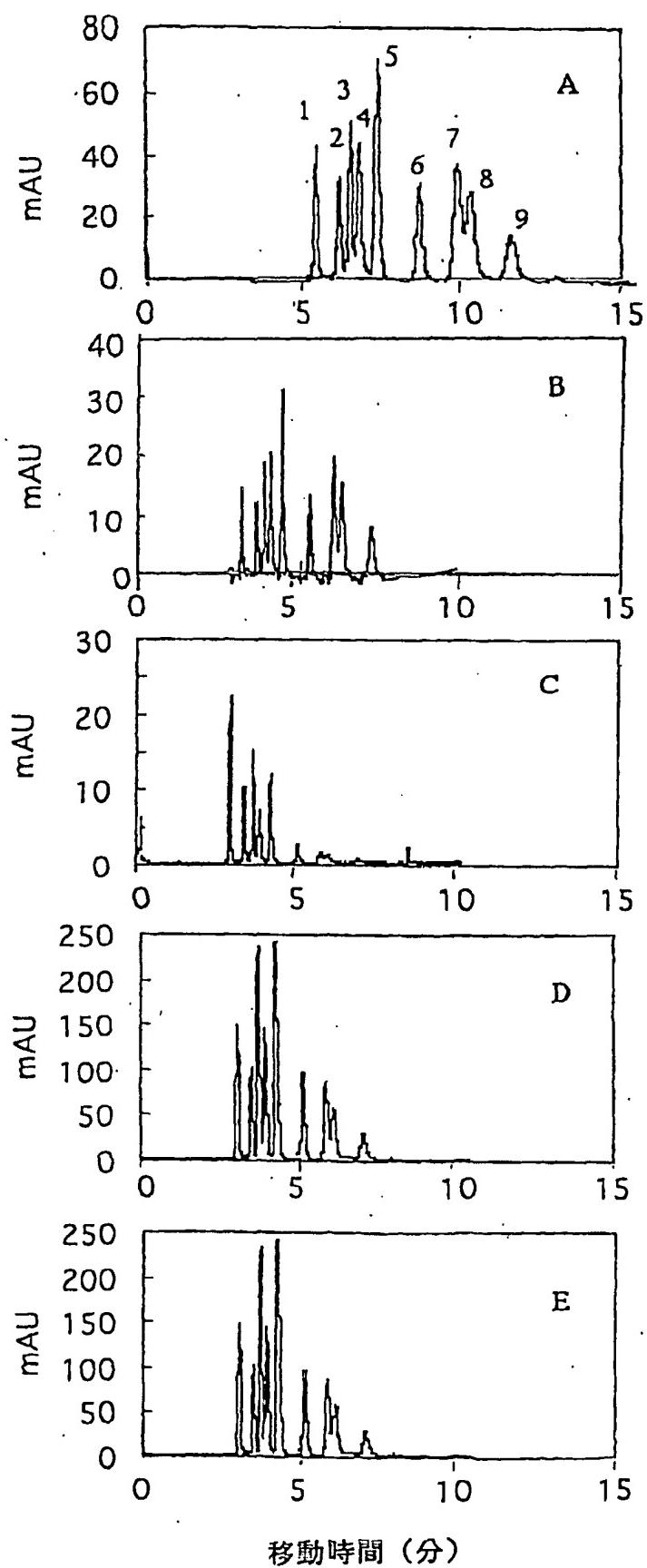
28. 請求項9～27いずれか1項に記載の電気泳動法により、高分子化合物を含有した試料を泳動して、該高分子化合物を分離し、分離された高分子化合物を検出して移動度を測定することを特徴とする、高分子化合物の解析方法。

29. 高分子化合物が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖鎖、多糖および核酸からなる群より選ばれた1種である、請求項28記載の高分子化合物の解析

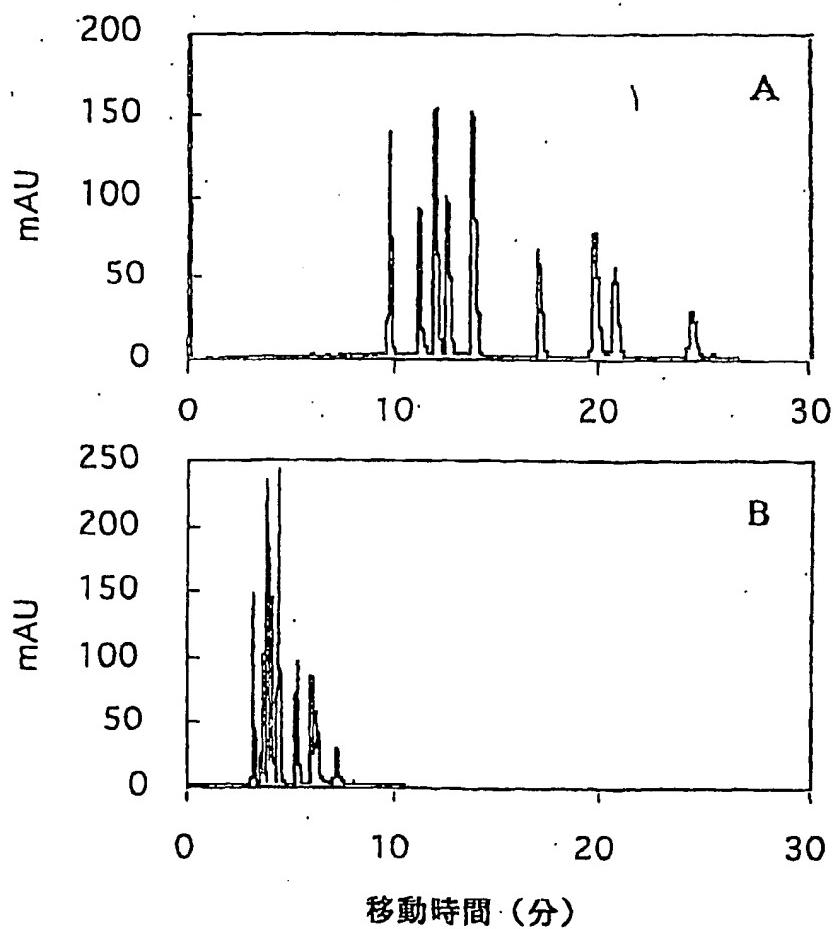
方法。

30. UV波長光の吸収、蛍光検出、電気化学的検出および化学発光検出からなる群より選ばれた少なくとも1種により、分離された高分子化合物を検出する、請求項28または29記載の高分子化合物の解析方法。

第 1 図

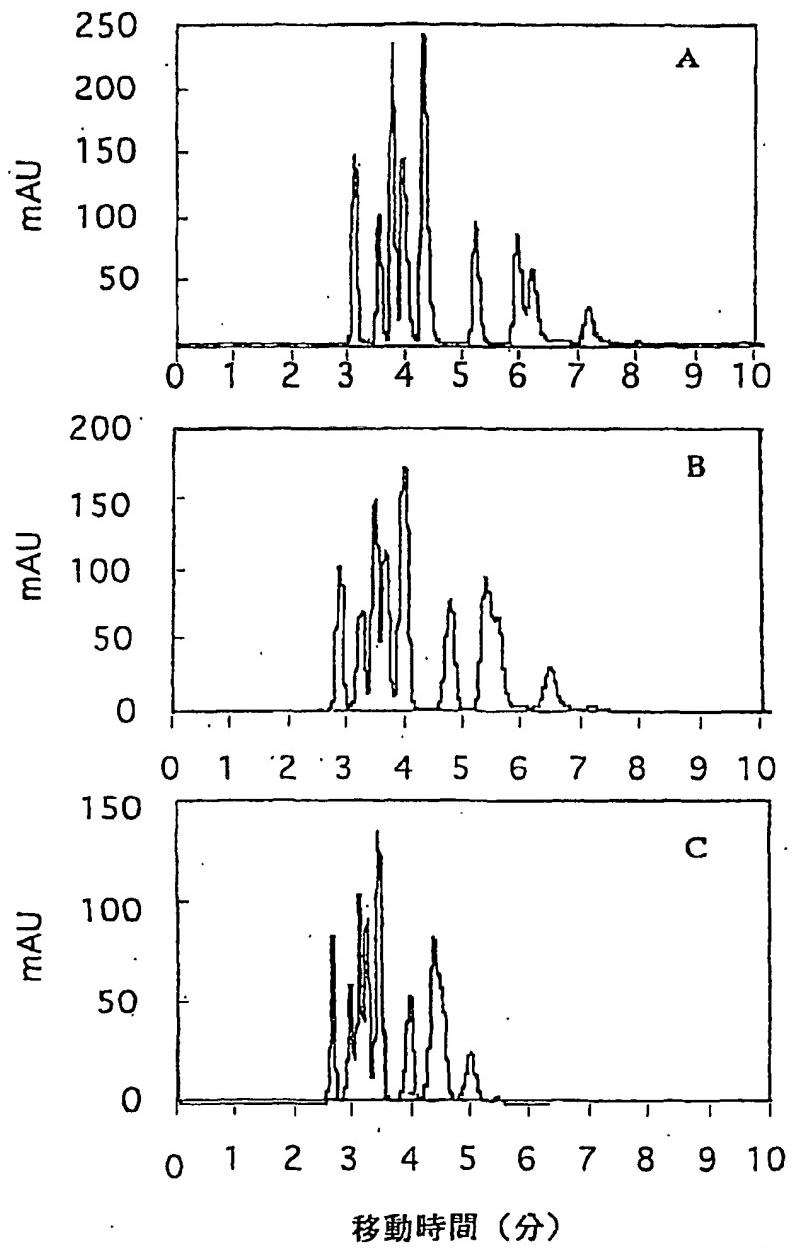


第 2 図

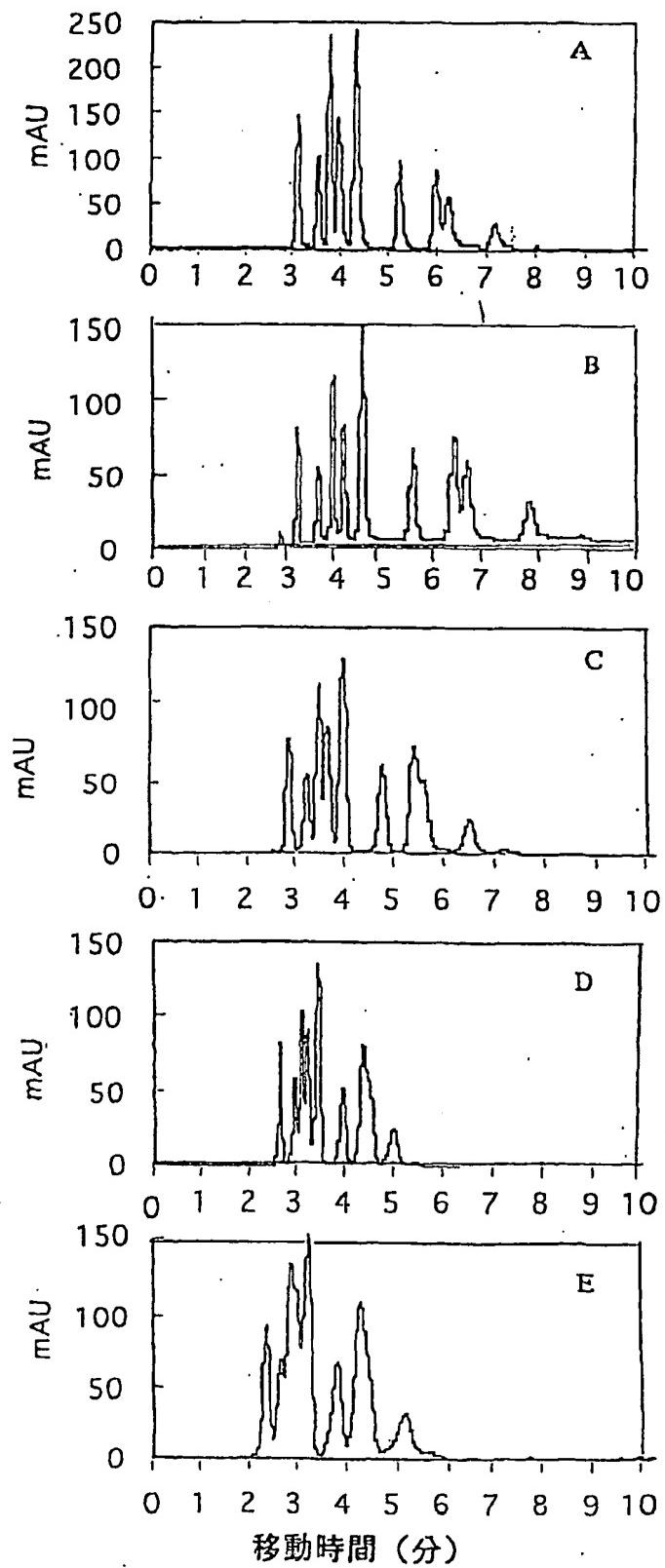


移動時間 (分)

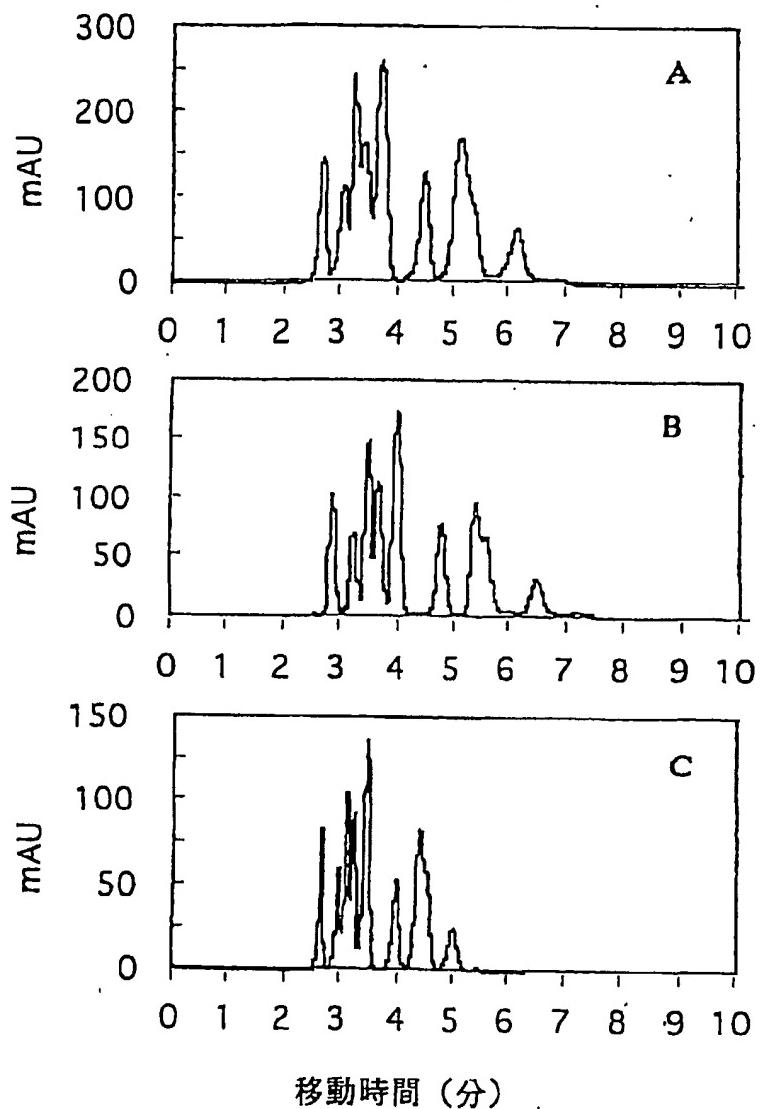
第 3 図



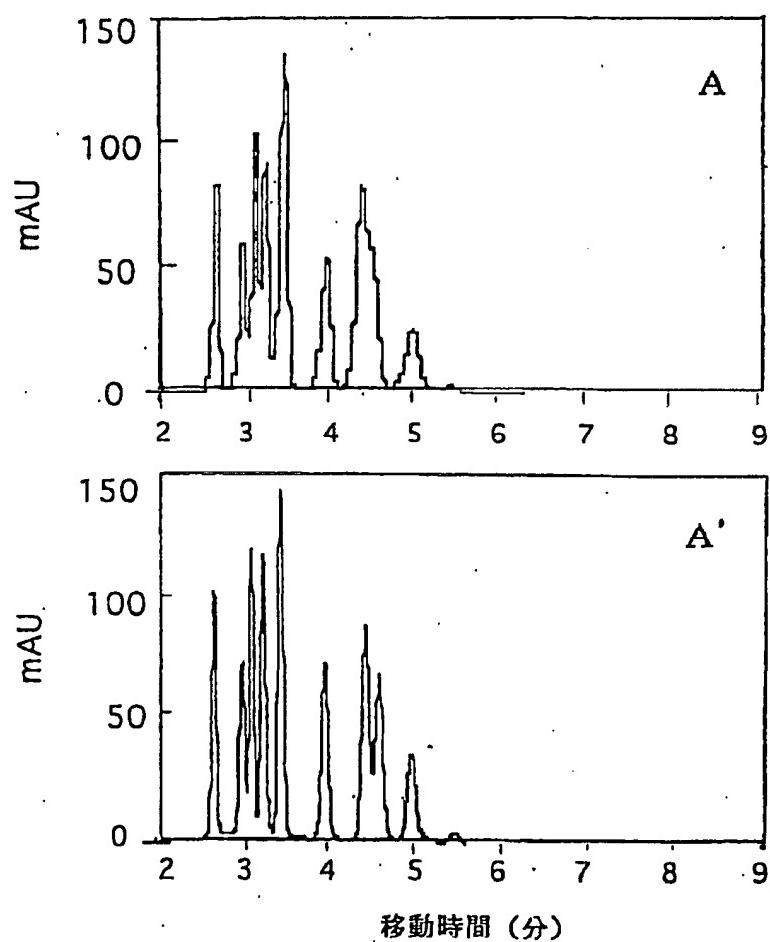
第 4 図



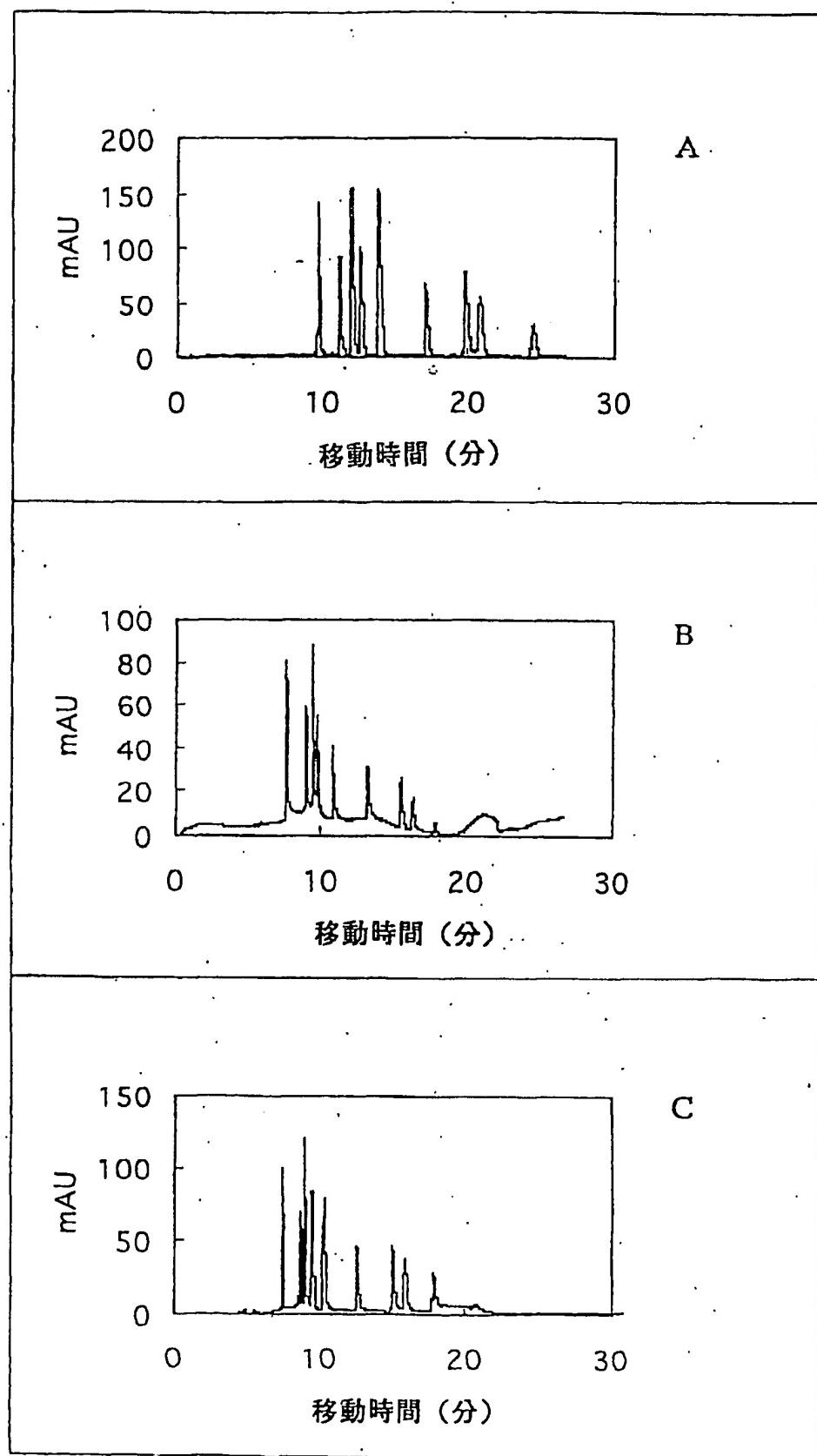
第 5 図



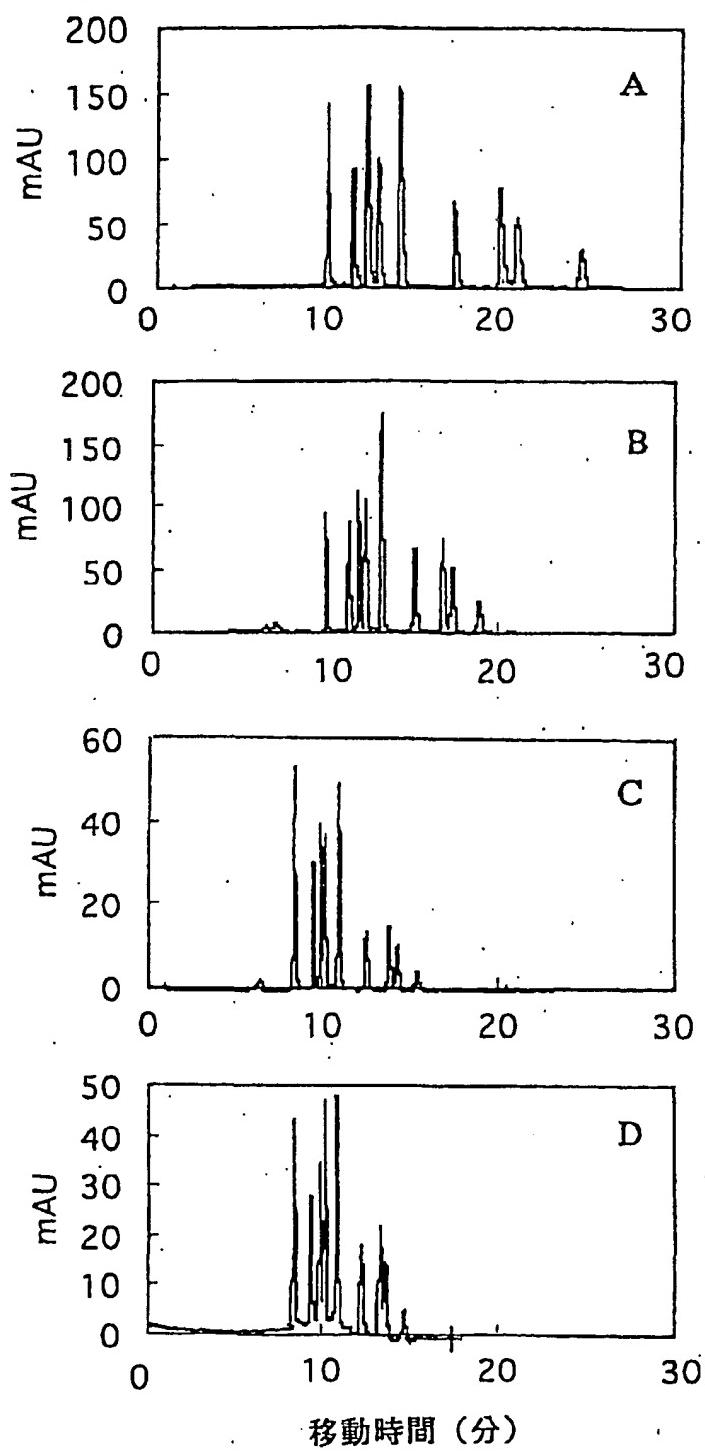
第 6 図



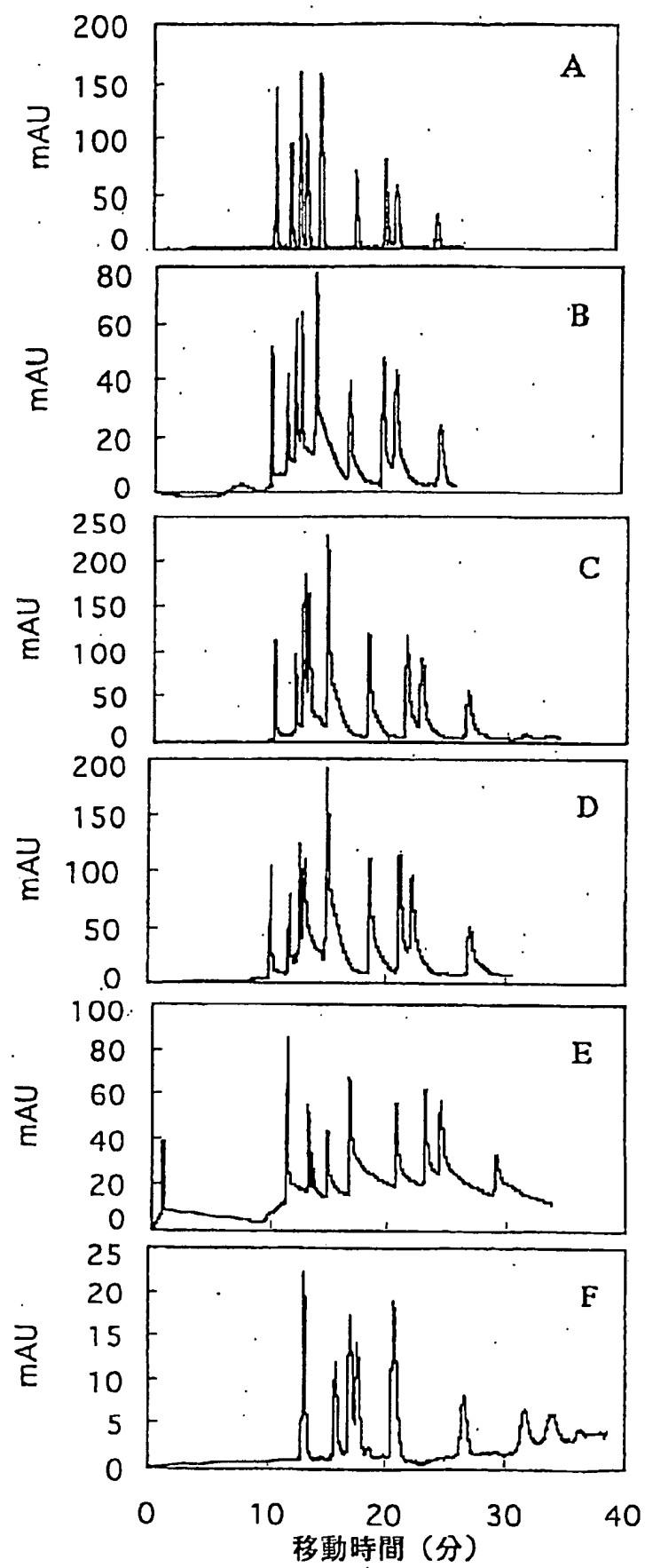
第 7 図



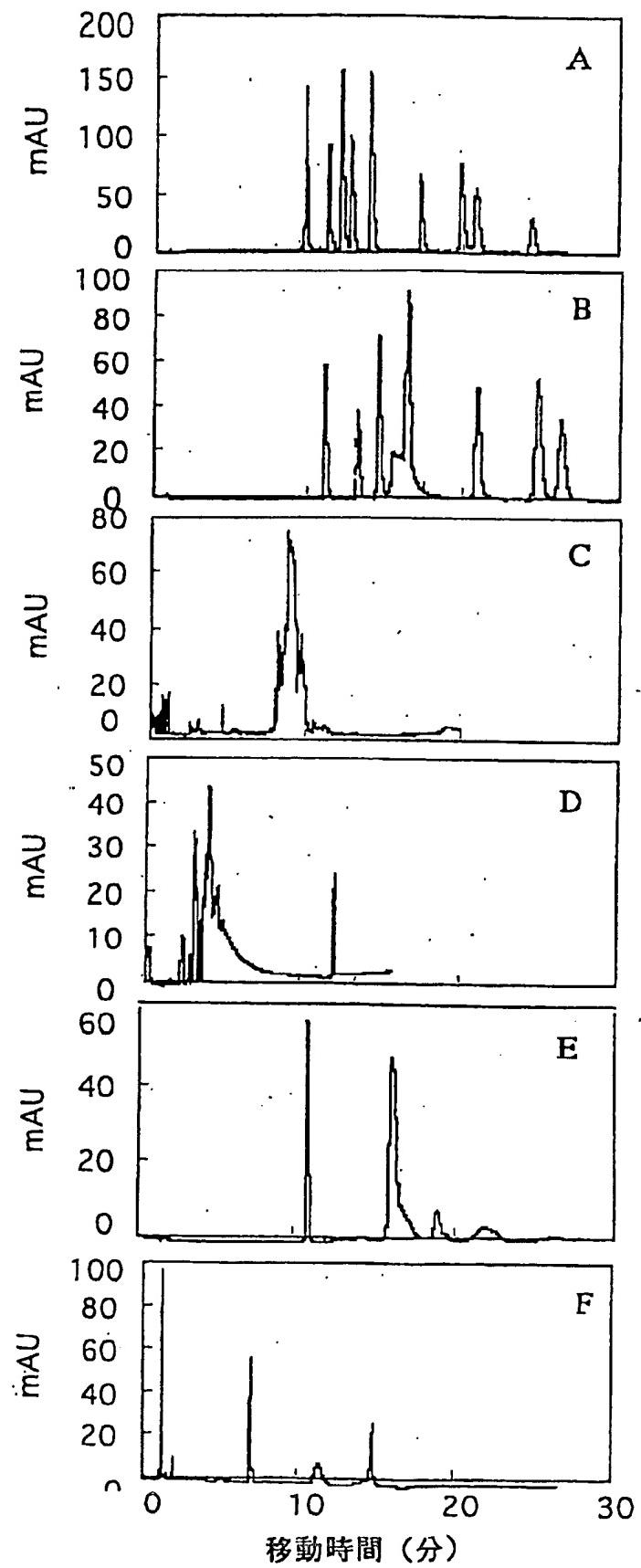
第 8 図



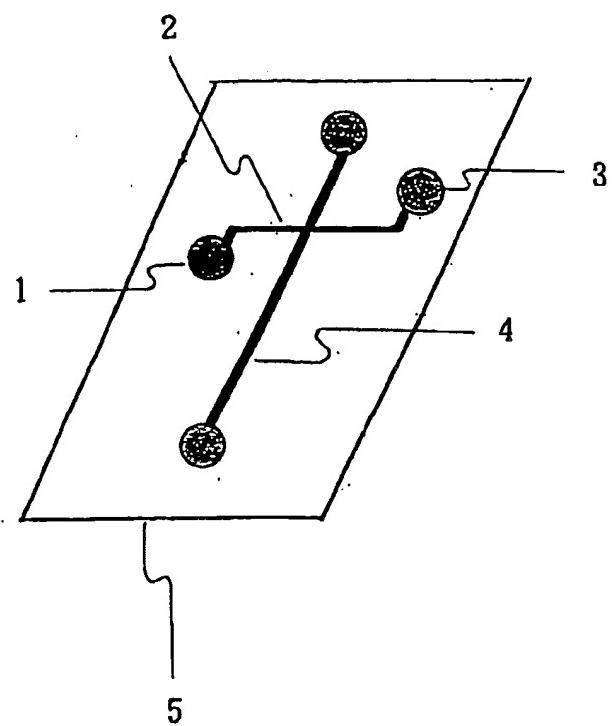
第 9 図



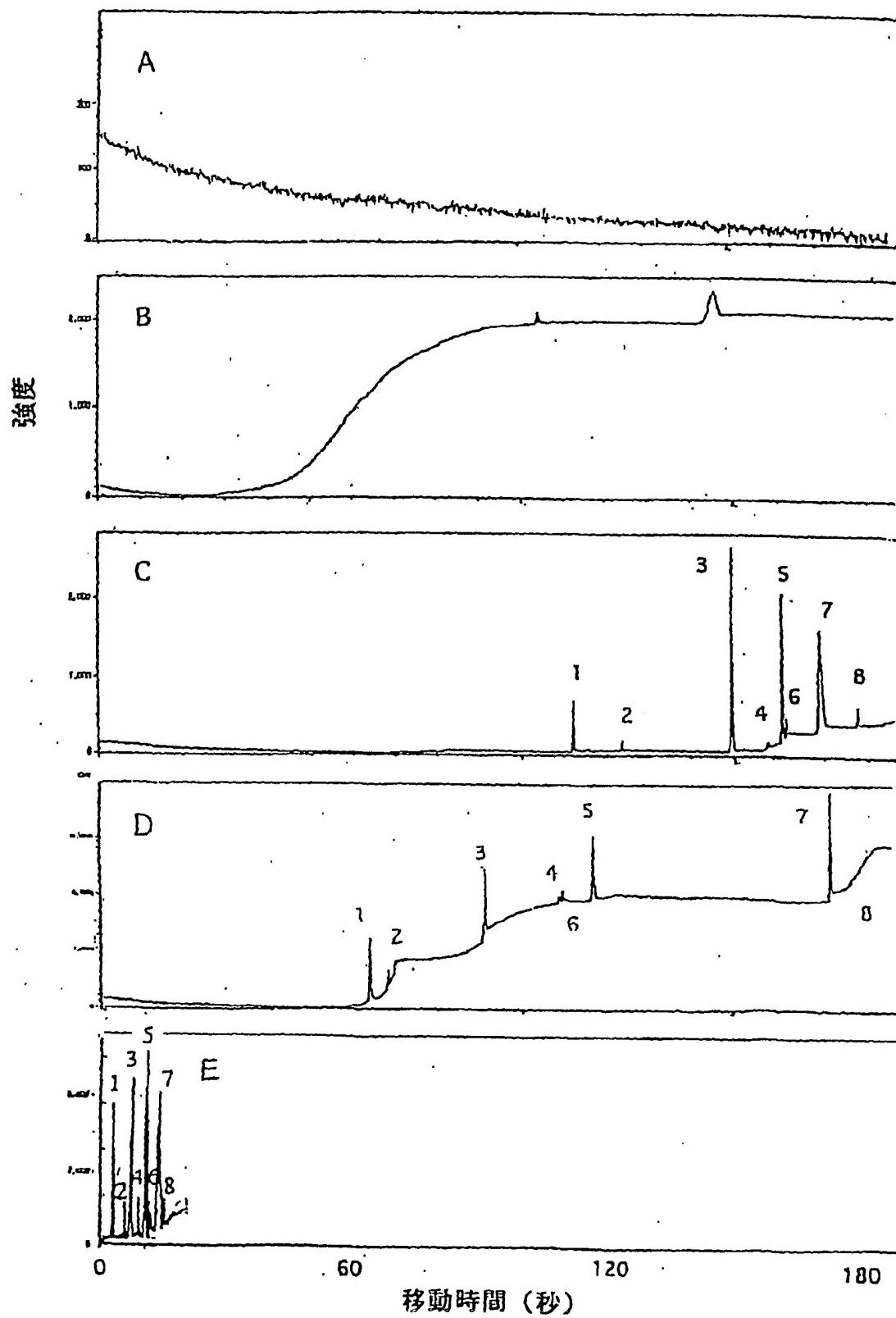
第 1 O 図



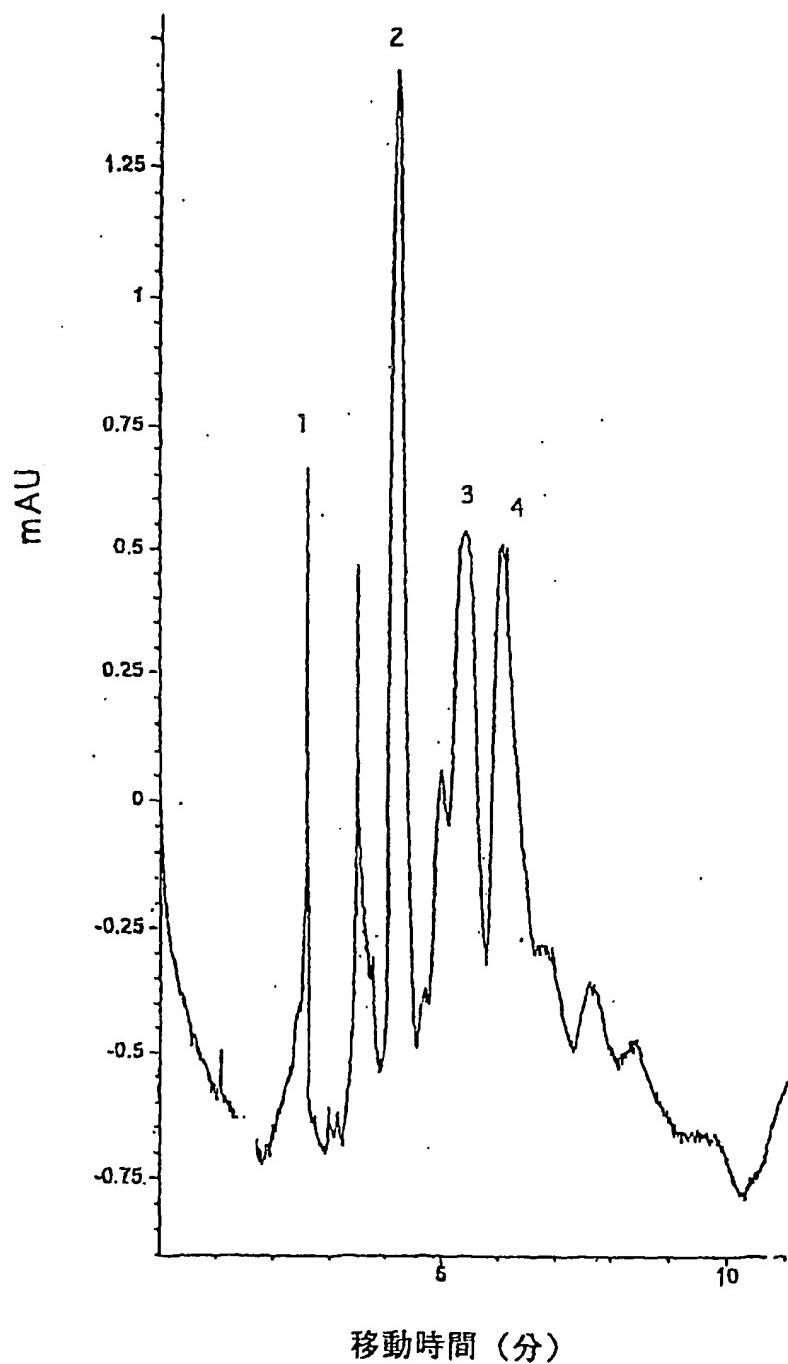
第 1 1 図



第 1 2 図

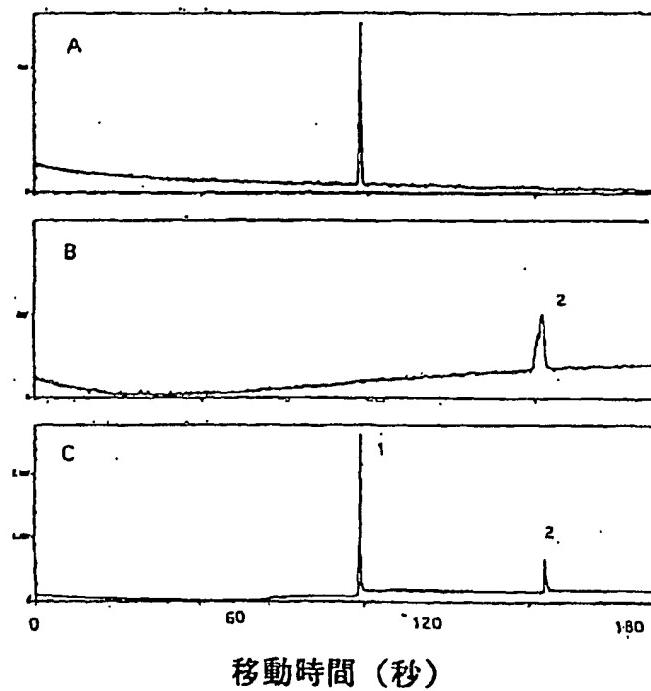


第 1 3 図



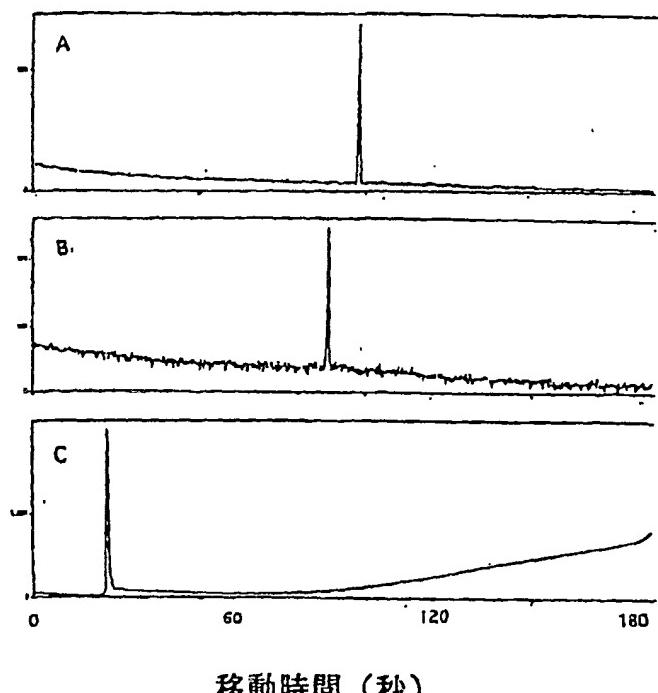
移動時間（分）

第 1 4 図

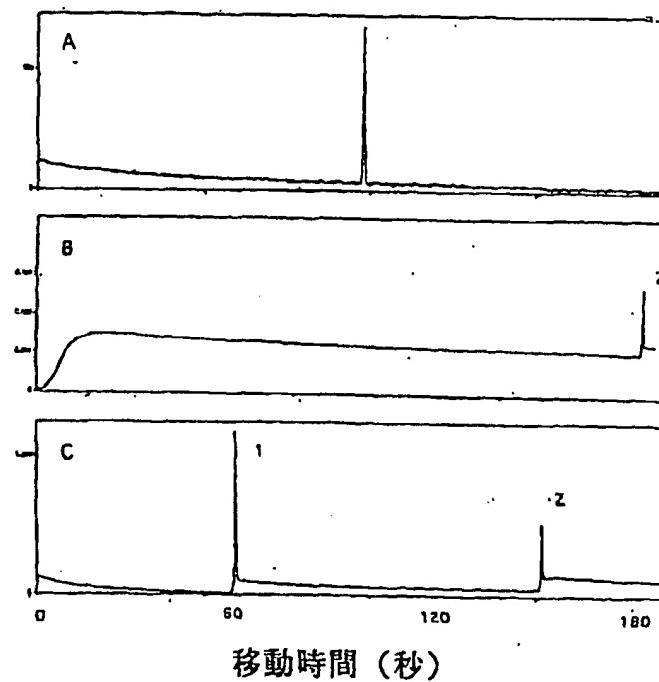


移動時間 (秒)

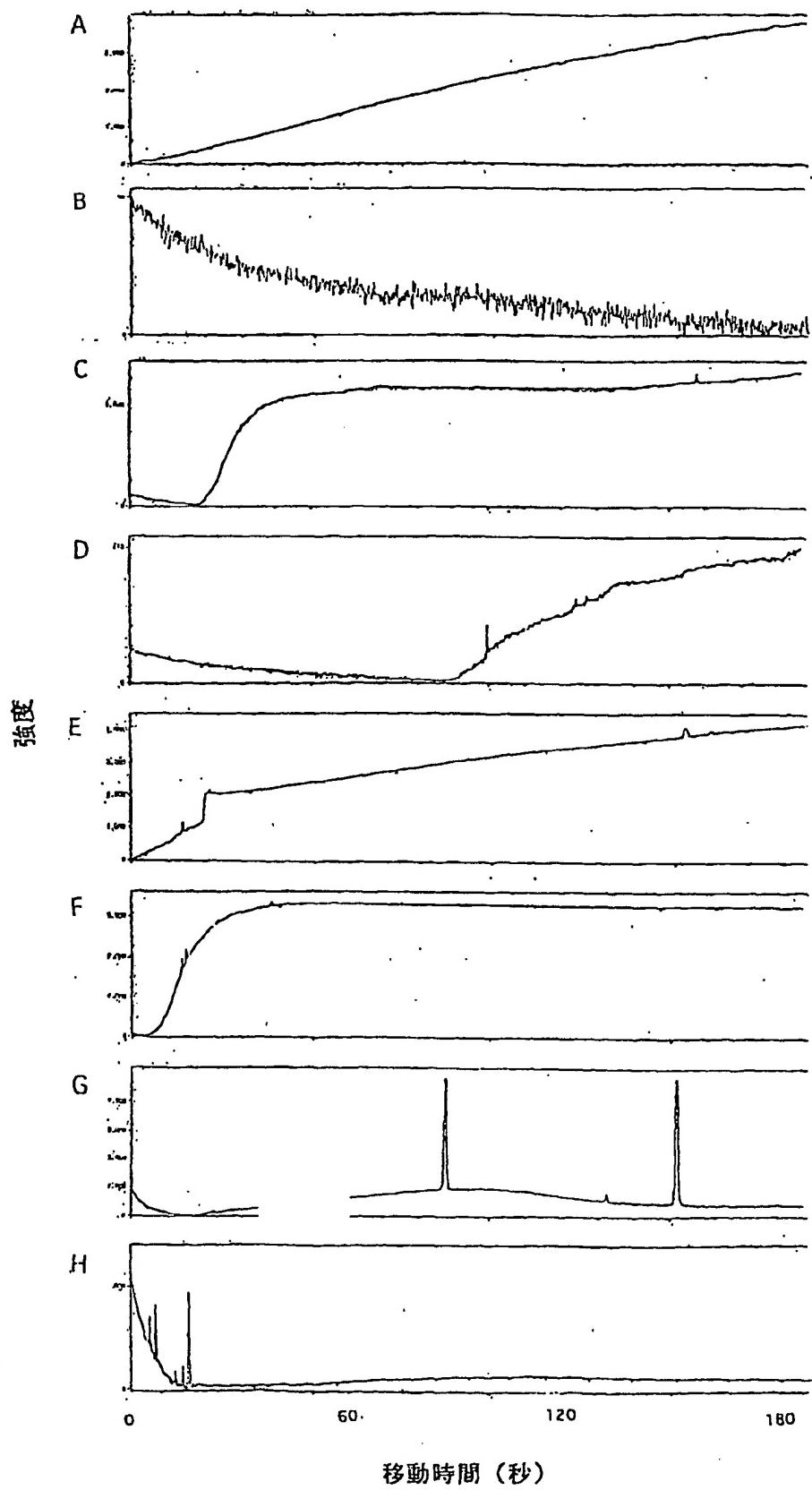
第 1 5 図



第 1 6 図



第 1 7 図



第VII欄 (v) 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

申立てでは実施細則第215号に規定する標準文書を使用して作成しなければならない。該文書と同様(i)～(v)の備考のお詫び部分、及び本頁に特有の事項について第VII欄(v)の備考を参照。この欄を使用しないときは、この用紙を廃棄に含めないこと。

不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）

本國際出願に関し、

科学技術振興事業団は、本國際出願の請求項に記載された対象が
以下のように開示されたことを申し立てる。

- (i) 開示の種類 刊行物
Publication
- (ii) 開示の日付 2000年11月29日 (29. 11. 00)
- (iii) 開示の名称 第20回 キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集
「キャピラリー電気泳動によるタンパク質の解析」
Proceedings of The 20th Symposium on Capillary
Electrophoresis
"Protein Analysis by Capillary Electrophoresis"
- (v) 本申立ては、国内特許又は広域特許のための日本および韓国の指定の
ためになされたものである。

- (i) 開示の種類 発表
Presentation
- (ii) 開示の日付 2000年12月1日 (01. 12. 00)
- (iii) 開示の名称 第20回 キャピラリー電気泳動シンポジウム 演題番号 P 217
Proceedings of The 20th Symposium on Capillary
Electrophoresis, Presentation Number P 217
"Protein Analysis by Capillary Electrophoresis"
- (iv) 開示の場所 淡路夢舞台国際会議場 (日本)
Awaji Yumebudai International Conference Center (Japan)
- (v) 本申立ては、国内特許又は広域特許のための日本および韓国の指定の
ためになされたものである。



この申立ての統葉として「第VII欄(v)の統葉」がある

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N27/ 447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N27/ 447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JOIS (JICST) (glucan + curdlan)*capillary ? electrophoresis (in Japanese)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y2	Mari TABUCHI, Yoshinobu BABA, Capillary Denki Eido ni yoru Tanpakushitsu no Kaiseki, Dai 20 kai Capillary Denki Eido Symposium Yoshishu, November 2000, p.210-211 Full text Full text	1-10 17
X Y2	EP 809103 A2 (FMC CO.), 26 November, 1997 (26.11.97), page 6, lines 9 to 14, 37 to 41 page 8, lines 17 to 23 & JP 11-23530 A	1-10 17
X	JP 2000-81417 A (RIKAGAKU KENKYUSHO), 21 March, 2000 (21.03.00), Column 4; Par. No. 39 (Family: none)	1,2
X	Masanori UEDA, Yoshinobu BABA, et. al., Microchip-ka Capillary Denki Eido-ho no yoru DNA Kaiseki, Dai 9 kai Bio Kou-Bunshi Symposium Yoshishu, July 1999, p.74-75 Full text	1

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
30 August, 2001 (30.08.01)

Date of mailing of the international search report
11 September, 2001 (11.09.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04510

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5069766 A (Bio-Rad Laboratories Inc.), 03 December, 1991 (03.12.91), Column 3; lines 35 to 56 & EP 516810 A & JP 5-504299 A	1
X	US 5482608 A (Hewlett-Packard Company), 09 June, 1996 (09.06.96), Full text	11, 12, 28-30
Y1	Full text	17
A	Full text	13-16, 18-27
	& EP 608120 A2 & JP 6-242073 A	
X	EP 386925 A1 (Hewlett-Packard Company), 12 September, 1990 (12.09.90), Full text	11, 12, 28-30
Y1	Full text	17
A	Full text & US 5061361 A1 & JP 7-159375 A	13-16, 18-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04510

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

For the following reason, the present international application have two groups of inventions, i.e., a group of the inventions as set forth in claims 1 to 10 (hereinafter referred to as the first group of inventions) and another group of the inventions as set forth in claims 11 to 30 (hereinafter referred to as the second group of inventions).

A comparison of the first group of inventions to the second group of inventions indicates that the first group of inventions involves inventions relating to the separation carrier as set forth in claim 1 as the general inventive concept, while the second group of inventions involves inventions relating to the electrophoresis method wherein a sample is pressurized before migration as set forth in claim 11 as a general inventive concept.

Such being the case, these two groups of inventions differing from each other in general inventive concept and there is no single general inventive concept common to them.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N27/447

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JOIS (JICST) (ジクシット) *キャピラリ?デンキエトワ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	田淵真理、馬場嘉信, キャピラリー電気泳動によるタンパク質の解析, 第20回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, 11月, 2000, p. 210-211 全文	1-10
Y2	全文	17
X	EP 809103 A2 (FMC CO.) 26. 11月. 1997 (26. 1 1. 97) 第6頁第9-14行, 37-41行	1-10
Y2	第8頁第17-23行 & JP 11-23530 A	17

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 08. 01

国際調査報告の発送日

11.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

(三井)
黒田 浩一

印 2J 3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-81417 A (理化学研究所) 21. 3月. 2000 (21. 0 3. 00), 第4欄, 第39段落 (ファミリーなし)	1, 2
X	上田正則、馬場嘉信、他4名, マイクロチップ化キャピラリー電気泳動法によるD NA解析, 第9回バイオ・高分子シンポジウム要旨集, 7月. 1999, p. 74 -75 全文	1
X	US 5069766 A (Bio-Rad Laboratories In c.) 3. 12月. 1991 (03. 12. 91) 第3欄, 第35-56行 & EP 516810 A, JP 5-504299 A	1
X	US 5482608 A (Hewlett-Packard Company) 9. 6月. 1996 (09. 06. 96) 全文	11, 12, 2 8-30
Y1	全文	17
A	全文	13-16, 1 8-27
	& EP 608120 A2, JP 6-242073 A	
	EP 386925 A1 (Hewlett-Packard Company) 1 2. 9月. 1990 (12. 09. 90) 全文	11, 12, 2 8-30
Y1	全文	17
A	全文	13-16, 1 8-27
	& US 5061361 A1, JP 7-159375 A	

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

この国際出願には、下記の理由により、請求の範囲1-10（以下、第1発明群という。）及び請求の範囲11-30（以下、第2発明群という。）の2つの発明がある。

第1発明群と第2発明群を対比すると、第1発明群が請求の範囲1に記載された分離用担体を一般的発明概念とする発明群であるのに対して、第2発明群は請求の範囲11に記載された、泳動前に試料を加圧する電気泳動方法を一般的発明概念とする発明群である。

このように両者は、一般的発明概念を異にしており、両者の間に单一の一般的発明概念が存在しない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。